



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y
Bioquímica



Servicio de Parasitología y Enfermedad de Chagas

Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Tesis Doctoral

*"Caracterización molecular de
mecanismos inflamatorios que
contribuyen al desarrollo de
miocardiopatía en la enfermedad de
Chagas"*

Lic. Romina Cutrullis

Director: Dr. Ricardo Corral

Directora Adjunta: Dra. Patricia Petray

Consejera de estudios: Dra. María Inés Vaccaro

2015

AGRADECIMIENTOS:

Durante estos años de trabajo de tesis, mucha gente se cruzó en mi camino. Todos me cambiaron de una manera u otra... Tratando de no olvidar a nadie, trataré de agradecer a todos!

A mi mamá y mi hermano Ale, que siempre nos mantuvimos juntos en los momentos difíciles... A mi viejo y mi hermano Paque, que seguro están juntos, dondequiera que estén!

A mi sobrino Ramiro, hermosa fotocopia de su padre... cuanto me alegro verte crecer!

Gracias al Dr Ricardo Corral, Richard, que desde el año 2004 (que ingresé como concurrente al hospital) hasta terminar la tesis, compartió conmigo su conocimiento, no sólo el científico, sino también el musical! PJ resultó un gran punto de encuentro. Un inmenso "gracias" a la Dra Patricia Petray, (Patry!) por las horas interminables que pasó conmigo enseñándome todo! Gracias por ser jefa, confidente, compañera... y ahora que finalizó la tesis, se convirtió en una gran amiga.

Qué hubiera sido de mí sin los chicos de Viro!!!! Sin ningún orden en particular: Meli, Magui, Mario, Pame, Pao, Juan, Vicky, Sandrita... Gracias!!!! Compartimos miles de mates (hasta los lavados), arreglos de aparatos, pedidos al hospital, charlas de catarsis tratando de sobrevivir a la tesis, rescate de gatos (cómo olvidarlo!), tardes de after-labs muertos de risa... sin duda, mi grupo de apoyo! Gracias a Gusy, por darme la oportunidad de incursionar en la docencia, y por sus implacables críticas constructivas! Gracias a Marce, que además de ayudarme con la triste tarea de pasar los ratones a mejor vida, terminamos coincidiendo en cosas mucho más importantes que la ciencia!

A Mariela Moreno Ayala, que mientras desarrollaba su tesina, compartimos más que sólo PCRs!!! Y a Agus Casasco, que recién empieza este camino de la tesis... suerte!

Gracias al grupo de Chagas: Jimmy, Héctor, Guille, Samy, Ernest, Gri, Migue, Margui, Facu... gracias por el lugar donde aterrizar, por la compañía, por los almuerzos con empanadas/sushi, por las clases de Estadística, los protocolos con pacientes... Aquellos que pasaron fugazmente: Matías, Tomás, Vicky, Lucía, Lety...

A la Dra Miriam Postan, quien me regaló horas enteras frente al microscopio analizando corazones y músculos infectados... me enseñó muchísimo de patología murina, gracias!!!!

A la Dra González Cappa, Dto de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UBA, que me cedió los parásitos de la cepa RA. A la Dra Mónica Esteva, del Instituto de Parasitología Fátala Chabén, fuente de las cepas Sylvio y Tulahuén. A la Dra Valentina Martín y a la (ya Dra?) Bibiana Volta, por su ayuda con los ELISAs.

A Daniela, la "jefa" del citómetro del IDEHU, que me ayudó tanto con las citometrías de flujo, dándome ánimos cuando las cosas no salían bien!!! A Fede Weill por su ayuda con los análisis!

A todos aquellos (ahora) biólogos con los que compartí miles de horas en la biblioteca de la facu comiendo talitas... hubiese sido imposible llegar hasta acá sin ellos. Empiezan siendo compañeros y terminan siendo colegas y amigos de la vida... Cómo sobrellevar la tesis sin saber que a todos nos pasaba lo mismo??? Pato, amiga y testigo de casamiento, gracias por haber estado conmigo con lágrimas y con sonrisas... Caro, Mecha, Vasca, Lei, Agus, famosa Claudia, Marian, Dari... gracias por las charlas sanadoras en la casa de Pato.

A Mechy y a Mary... inseparables amigas desde la adolescencia y hasta el final! Cuántas cosas pasamos! A mi "sobrina" Caro, que la ví nacer y se convirtió en una mujer maravillosa! A Manu, un hombrecito ya...

A mi familia política, que me trata como una hija más... Los primos: Yas, Sol, Nai, Dani, Vane y Patry y los tíos Claudia, Nuri y Alex...

Y cómo dar las gracias a Diego, mi amor y compañero de vida... un ser muy luminoso que me regaló a Uri, nuestro gran logro! Ese bomboncito que con solo sonreír, nos derrite de amor! Gracias por bancarme en todas y estar incondicionalmente... gracias por enseñarme tanto y formar una hermosa familia (con Jony, More... y Garu incluido)!

Y sobre todo, gracias a *Ab-bá*, por cambiarme la vida!

Gracias a todos por formar parte del camino...

Lehaim!

TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE EL PERÍODO DE TESIS:

"Archaeosome vaccine adjuvants enhance primary and memory immune responses." González, RO; Morilla, MJ; **Cutrullis, RA**; Corral, RS; Petray, PB; Romero, EL. *BMC Biotechnology*. 13;9:71. 2009.

"Timing of expression of inflammatory mediators in skeletal muscles from mice acutely infected with the RA strain of *Trypanosoma cruzi*". Cutrullis, R; Postan, M; Petray, P; Corral, R. *Pathobiology*, Vol 76: 170-180. 2009.

"Effect of ganglioside treatment on experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection". Cutrullis, R; Poklépovich T; Postan, M; Freilij, H; Petray, P. *International Immunopharmacology*, 11(8):1024-31. 2011.

"Benznidazole therapy modulates interferon- γ and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children." Cutrullis, R; Moscatelli, G; Moroni, S; Volta, B; Cardoni, R; Altcheh, J; Corral, R; Freilij, H; Petray, P. *PLoS One*, 6(10):e27133. 2011.

"Elevated serum levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with progressive chronic cardiomyopathy in patients with Chagas disease". Cutrullis, R; Petray, P; Schapachnik, E; Sánchez, R; Postan, M; González, M; Martín, V; Corral, R. *PLoS One*. 8(2):e57181.doi: 10.1371/journal.pone.0057181. 2013.

"Efficacy of voriconazole in a murine model of acute *Trypanosoma cruzi* infection". Gulin JE, Eagleson MA, Postan M, **Cutrullis RA**, Freilij H, Bournissen FG, Petray PB, Altcheh J. *J Antimicrob Chemother*. 68(4):888-94. 2013.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN copia
Akt	Proteína quinasa B
ANOVA	Análisis de la varianza
AP-1	Proteína activadora 1 (del inglés <i>Activator protein 1</i>)
APC	Aloficocianina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Seroalbúmina bovina
BZ	Benznidazol (<i>N</i> -benzil-2-nitroimidazol acetamida)
CA	Hospital General de Agudos Dr Cosme Argerich
CCL2/MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
CCL3/MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α
CCL4/MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 β
CCL5/RANTES	Proteína regulada por activación, secretada y expresada en células T normales
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CpG	dinucleótido Citosina – Guanina, con unión de grupo fosfato
CQ	Citoquinas
CXCL9/MIG	Monoquina inducible por IFN- γ
CXCL10/IP-10	Proteína inflamatoria 10
DA	Diámetro de la aorta
DAB	Diaminobencidina
DAI	Diámetro aurícula izquierda
DCreg	Célula dendrítica reguladora (del inglés <i>regulatory dendritic cell</i>)
DCFH	2',7' diacetato de diclorofluoresceína
DDVI	Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo
dil	dilución
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato

dpi	días post-infección
DSVI	Diámetro sistólico del ventrículo izquierdo
DTT	Ditiotreitol
ECG	Electrocardiograma
ECh	Enfermedad de Chagas
ECO	Ecocardiograma
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzimoimmunoensayo (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
ERO	Especies reactivas del O ₂
ESM	Error estándar de la media
FA	Fracción de acortamiento
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersión frontal (<i>forward scatter</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G.I	Grado de inflamación
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HAI	Hemaglutinación indirecta
HNRG	Hospital de Niños Dr Ricardo Gutiérrez
ICAM-I	Molécula de adhesión intercelular I (del inglés <i>Intercellular Adhesion Molecule I</i>)
IFN-γ	Interferón γ
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
iNOS	Sintetasa de óxido nítrico inducible
MAPK	Quinasa de proteínas dependiente de mitógeno (del inglés <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
MIF	Factor de inhibición de la migración de macrófagos (del inglés <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>)
MIFr	MIF recombinante
min	minutos
MMLV	Virus de la leucemia murina de Moloney

NF	Nifurtimox [(RS)-N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina]
NF-κB	Factor nuclear κB (del inglés <i>Nuclear factor κB</i>)
NK	Células citocidas naturales (del inglés <i>Natural Killer</i>)
NKT	Células citocidas naturales provenientes del linaje T
NLR	Receptores tipo NOD (del inglés <i>NOD Like Receptor</i>)
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
•OH	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
P53	Proteína tumoral 53
PAS	Tinción con ácido peryódico/base de Schiff para macromoléculas glicosiladas
PBS	Tampón (<i>Buffer</i>) fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-AS	Proteína C reactiva de Alta Sensibilidad
PE	Ficoeritrina
PerCP-Cy	Proteína clorofila peridina-R-ficoeritrina cianina
PEST	Penicilina y estreptomicina
PP	Pared posterior
PPA	Aglutinación pasiva de partículas
QQ	Quimioquinas
RIG-1	Gen 1 inducible por ácido retinoico (del inglés <i>retinoic acid-inducible gene 1</i>)
RM	Hospital General de Agudos Dr José María Ramos Mejía
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Medio básico de crecimiento celular
RQQ	Receptores para quimioquinas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
seg	segundos
SFB	Suero fetal bovino
SI	Septum interventricular
SSC	Dispersión lateral (<i>side scatter</i>)
T°amb	Temperatura ambiente
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

TdT	Enzima Desoxinucleotidiltransferasa terminal
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β (del inglés <i>Transforming Growth Factor</i> β)
TH1	Respuesta de Linfocitos T <i>helper</i> de tipo 1
TLR	Receptores tipo Toll (del inglés <i>Toll Like Receptor</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Treg	Linfocitos T reguladores
TUNEL	Técnica para la detección de apoptosis celular tardía (del inglés <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediate UTP end labelling</i>)
VCAM-I	Molécula de adhesión a la célula vascular I (del inglés <i>Vascular cell adhesion molecule</i>)

ÍNDICE

Pág

RESUMEN.....	15
---------------------	-----------

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Chagas: generalidades.....	19
1.1. Agente etiológico.....	20
2. Curso de la infección por <i>T. cruzi</i>	22
3. Diagnóstico de laboratorio de la infección por <i>T. cruzi</i>	23
4. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas.....	24
5. Patogénesis de la enfermedad de Chagas.....	26
6. Respuesta inmune a la infección: generalidades.....	29
7. Papel dual de citoquinas en la respuesta inflamatoria generada por <i>T. cruzi</i>	32
8. Factor de inhibición de la migración de macrófagos.....	34
9. Quimioquinas y sus receptores en la enfermedad de Chagas.....	36

OBJETIVOS

1. Objetivo general.....	42
1.1. Objetivos específicos.....	42

MATERIALES Y MÉTODOS

1. <u>Ensayos <i>in vitro</i></u>	
1.1. Cultivo de la línea celular HL-1 de cardiomiocitos murinos.....	44

1.2.	Cultivo de la línea celular VERO de fibroblastos de mono	44
1.3.	Cultivo de la línea celular J774 de macrófagos murinos.....	44
1.4.	Cultivo de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	44
1.5.	Ensayos de actividad de MIF sobre macrófagos.....	45
1.6.	Estudio de mecanismos parasitocidas inducidos por MIF.....	46
1.6.1.	Cuantificación de NO.....	47
1.6.2.	Cuantificación de ERO.....	47
1.6.3.	Cuantificación de TNF- α	47
1.7.	Producción de MIF por macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i>	48
1.8.	Estimulación de cardiomiocitos con MIF e infección con <i>T. cruzi</i>	48
1.9.	Detección de apoptosis celular en cardiomiocitos estimulados/infectados...	48
2.	<u>Ensayos <i>in vivo</i> en un modelo murino de infección por <i>T. cruzi</i></u>	
2.1.	Modelo animal de etapa aguda:	
2.1.1.	Infección experimental con <i>T. cruzi</i>	50
2.1.2.	Estudios histopatológicos de corazón y músculo esquelético.....	50
2.1.3.	Estudio de la expresión tisular de mediadores inflamatorios.....	51
2.1.3.1.	A nivel del ARN mensajero.....	51
2.1.3.2.	A nivel de proteínas.....	56
2.2.	Modelo animal de etapa crónica:	
2.2.1.	Modelos de infección crónica indeterminada y severa.....	57
2.2.2.	Aislamiento y caracterización fenotípica del infiltrado inflamatorio de miocardio y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ratones infectados.....	57

2.2.3. Tratamiento con benznidazol durante la etapa crónica de la enfermedad de Chagas experimental.....	58
2.2.4. Estudio de la expresión tisular de mediadores inflamatorios.....	59
3. <u>Ensayos en la infección humana por <i>T. cruzi</i>.</u>	
3.1. Aspectos éticos.....	59
3.2. Selección y caracterización de la población.....	59
3.3. Determinación de mediadores inflamatorios	
3.3.1. En células sanguíneas.....	61
3.3.2. En suero.....	61
4. <u>Análisis Estadístico</u>	62

RESULTADOS

1. <u>Papel de MIF en la respuesta inflamatoria que se desarrolla en la etapa temprana de la infección con <i>T. cruzi</i>.</u>	
1.1. Efecto de MIF en la reducción del número de macrófagos infectados y la eliminación de parásitos intracelulares.....	64
1.2. Efecto sinérgico de MIF e IFN- γ en la activación de macrófagos.....	66
1.3. Efecto inductor de MIF sobre los macrófagos.....	67
1.4. Mecanismos parasitocidas inducidos por MIF en fagocitos.....	68
1.5. Producción de MIF en macrófagos infectados.....	70
1.6. Caracterización de la infección aguda por <i>T. cruzi</i> en ratones.....	71
1.7. Expresión de MIF en la etapa aguda de la infección experimental.....	73
1.8. Niveles de MIF en el suero de pacientes pediátricos en etapa aguda de la infección.....	75

2.	<u>Papel de MIF en los mecanismos de inflamación que se desarrollan en la etapa crónica de la infección con <i>T. cruzi</i>.</u>	
2.1.	Expresión de MIF en la etapa crónica indeterminada y severa de la infección experimental y humana.....	76
2.2.	Correlación del nivel circulante de MIF con parámetros ecocardiográficos y de laboratorio representativos de daño cardíaco.....	80
2.3.	Papel de MIF en la regulación de la apoptosis de cardiomiocitos generada por la infección con <i>T. cruzi</i>	83
3.	<u>Entorno inflamatorio que acompaña a MIF en las distintas etapas de la infección.</u>	
3.1.	Expresión de mediadores inflamatorios en corazón y músculo esquelético de ratones infectados en etapa aguda y crónica.....	85
3.2.	Caracterización fenotípica de las CMSP y del infiltrado inflamatorio de tejido cardíaco en ratones con infección crónica.....	94
4.	<u>Efecto inmunomodulador del benznidazol administrado en la etapa crónica de la infección chagásica.</u>	
4.1.	Expresión de MIF y parámetros histopatológicos en corazón y músculo esquelético luego de administrar benznidazol a ratones con infección prolongada.....	97
4.2.	Expresión de mediadores inflamatorios en CMSP y suero de pacientes cursando la etapa crónica temprana de la infección luego del tratamiento parasiticida.....	100

DISCUSIÓN

Papel de MIF en los mecanismos de respuesta inflamatoria generados en la etapa temprana de la infección por <i>T. cruzi</i>	103
---	-----

Papel de MIF en los mecanismos de respuesta inflamatoria generados a lo largo de la etapa crónica de la infección con <i>T. cruzi</i>	107
---	-----

CONCLUSIONES GENERALES.....	114
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
ANEXO.....	145

RESUMEN

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, se caracteriza por una intensa miocardiopatía inflamatoria generada primariamente por la infección, pero sostenida en el tiempo por mecanismos que aún no se conocen de manera acabada. Diversos mediadores de la respuesta inmune del hospedador infectado podrían ser en parte responsables de la fisiopatogenia de la enfermedad.

El objetivo general del presente trabajo fue examinar la contribución de distintos mediadores inflamatorios (citoquinas, quimioquinas y sus receptores específicos) a la inmunopatogénesis de la miocardiopatía chagásica y evaluar el efecto modulador que el tratamiento etiológico con benznidazol pudiera ejercer sobre estos mediadores y la patología inflamatoria.

Nuestro estudio hizo foco en factores potenciales de patogenia chagásica que permanecían inexplorados, como la citoquina proinflamatoria MIF, analizando su relevancia biológica tanto en el modelo animal como en pacientes infectados con distinto grado de compromiso cardíaco.

La infección aguda por *T. cruzi* induce la producción temprana de MIF, el cual cumple un rol importante en la resistencia frente al parásito. MIF demostró *in vitro* ser un agente que favorece, *per se* o en forma sinérgica con IFN- γ , la eliminación temprana de los parásitos intracelulares por los macrófagos, promoviendo la generación de otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α , especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico. En la infección reciente, los pacientes presentaron niveles circulantes incrementados de MIF, que estarían vinculados con un mecanismo defensivo precoz frente al *T. cruzi*. Más allá de su función inmunoprotectora, la producción local exacerbada de MIF puede asociarse con el daño inflamatorio muscular que se verifica al inicio de la infección. En ratones con Chagas agudo encontramos que MIF se expresa en áreas de inflamación en tejidos musculares claves (miocardio y músculo esquelético), tanto en las miofibras como en los leucocitos infiltrantes. Este incremento temprano de MIF se localiza en un entorno caracterizado por un aumento en la expresión muscular de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α), quimioquinas

(CCL5, CXCL9) y sus receptores específicos (CCR5, CXCR3), en paralelo con la severidad de la carga parasitaria y de la injuria tisular.

Una vez contenido el avance del parásito, la inducción persistente de mediadores inflamatorios es capaz de provocar daño en tejidos, agravando el curso de la infección. En este sentido, en pacientes con Chagas crónico hallamos que el nivel sérico de MIF era más elevado en aquéllos que presentaban sintomatología severa que en los individuos asintomáticos. Se verificó la existencia de correlación entre los valores de MIF circulante y parámetros ecocardiográficos (diámetro ventricular, auricular y de aorta; fracción de acortamiento) y de laboratorio (proteína C reactiva de alta sensibilidad en suero) indicativos del grado de disfunción cardíaca causada por la infección prolongada con *T. cruzi*. Coincidentemente, demostramos una alta producción de MIF (en cardiomiocitos e infiltrado inflamatorio) en el corazón de ratones con miocarditis por infección a largo plazo con *T. cruzi*, mientras que dicha inducción aparecía notoriamente atenuada en la forma indeterminada de la enfermedad. Esto reafirma la asociación planteada entre incremento progresivo de la expresión de MIF, patología inflamatoria y miocardiopatía chagásica crónica. El aumento de MIF podría ser un factor patogénico en la etapa crónica de la infección, aportando al daño en corazón y musculatura esquelética mediante el reclutamiento y activación de células mononucleares productoras de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas del oxígeno. Sumado a su rol proinflamatorio, MIF podría por otro lado contribuir a preservar los cardiomiocitos, protegiéndolos de la apoptosis resultante de la interacción con el parásito, y favorecer así el establecimiento de una infección crónica por *T. cruzi* en miocardio.

Además, en ratones con infección crónica se registró una inducción del receptor de quimioquinas CXCR3 en células mononucleares de sangre periférica. La identificación de una fracción de la subpoblación T CD8⁺, predominante en el infiltrado inflamatorio crónico en miocardio de animales infectados, que co-expresa CXCR3 en su superficie sugiere que al menos algunas de estas células pueden migrar al tejido cardíaco, probablemente por estímulo quimiotáctico de CXCL9.

También evaluamos si la terapéutica anti-*T. cruzi* con benznidazol provoca algún impacto sobre los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias, incluyendo MIF. En pacientes pediátricos en el estadio indeterminado registramos una tendencia decreciente para MIF y una reducción de los niveles de IFN- γ a lo largo del seguimiento

post-tratamiento. Más aún, en el modelo murino encontramos que la administración de la droga parasitocida durante la fase crónica de la infección -tendencia de creciente consenso en la actualidad- modula negativamente la expresión de MIF en miocardio y reduce la patología inflamatoria en tejidos cardíacos. Así, a la actividad parasitocida del benznidazol cabe añadir su capacidad inmunomoduladora que ayudaría a limitar una respuesta inflamatoria exacerbada y la injuria en órganos claves del hospedador.

En vista de nuestros resultados, concluimos que MIF es un factor importante para el control del parásito en el período inicial de la infección, pero de persistir su inducción durante la etapa crónica podría convertirse en un mediador inflamatorio que puede contribuir a la progresiva disfunción cardíaca generada por *T. cruzi*. El tratamiento etiológico con benznidazol durante la infección crónica sería capaz de ejercer un efecto inmunomodulador sobre MIF, de modo de mantener bajo control su potencial patogénico. En conjunto, estas observaciones representan un aporte para esclarecer los elementos participantes de mecanismos inmunopatogénicos asociados con la miocardiopatía chagásica y podrían ser útiles en el diseño de terapias novedosas para controlar la morbilidad a largo plazo en los pacientes chagásicos.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Chagas: generalidades

La enfermedad de Chagas (ECh), causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es la principal causa mundial de muerte por dolencia cardíaca de origen infeccioso, constituyendo así un problema de relevancia sanitaria sobre todo en América Latina. Aproximadamente 10 millones de individuos están infectados con el parásito y unas 12.000 muertes anuales se asocian con la infección, surgiendo 56.000 nuevos casos por año^{1,2}. Paulatinamente, esta enfermedad está invadiendo países que la desconocían, debido a la migración de individuos originarios de zonas endémicas. Es así como Estados Unidos de América y España informan alrededor de 300.000 y 65.000 personas infectadas, respectivamente^{3,4}.

En nuestro país, cerca de 1.700.000 personas padecen esta enfermedad, siendo la población de áreas rurales endémicas la más vulnerable. Actualmente, las regiones con alto riesgo para la transmisión vectorial comprenden las provincias del norte del territorio, como Chaco, Formosa, Salta y Santiago del Estero, y del oeste, como San Juan y Mendoza⁵. Si bien se ha reducido la tasa de infestación domiciliar por el insecto vector entre los años 1982 y 1993⁶, la situación no se encuentra completamente controlada. Para interrumpir la transmisión, es necesario optimizar las actividades de control vectorial y no vectorial, con una vigilancia activa permanente y con el diagnóstico y tratamiento oportuno de las personas infectadas. En base al trabajo sostenido en los últimos años, se ha logrado interrumpir la transmisión vectorial y transfusional en 8 provincias argentinas (Informe Oficial del Programa Nacional de Chagas del Ministerio de Salud de la Nación, agosto 2012).

Hace dos décadas, los programas de control apuntaban exclusivamente a la eliminación del insecto vector¹ y la interrupción de la transmisión transfusional del parásito⁷. En la actualidad, con el uso de nuevas técnicas y estrategias, se intenta abarcar distintos ámbitos relacionados con la enfermedad, antes desatendidos: control vectorial (mejoramiento de viviendas, ampliación de vigilancia), control transfusional (expansión de las redes de control serológico de donantes), diagnóstico del infectado (desarrollo de reactivos, mejoramiento de técnicas, detección del ADN del parásito), manejo del infectado agudo (mejor diagnóstico y acceso al tratamiento parasiticida) y del crónico (alternativas para diagnóstico, nuevos fármacos, evolución tecnológica y procedimientos quirúrgicos)⁸.

1.1- Agente etiológico

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoo intracelular obligado, uniflagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, que presenta una organela distintiva, el cinetoplasto. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Dominio: Eucaria

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatida

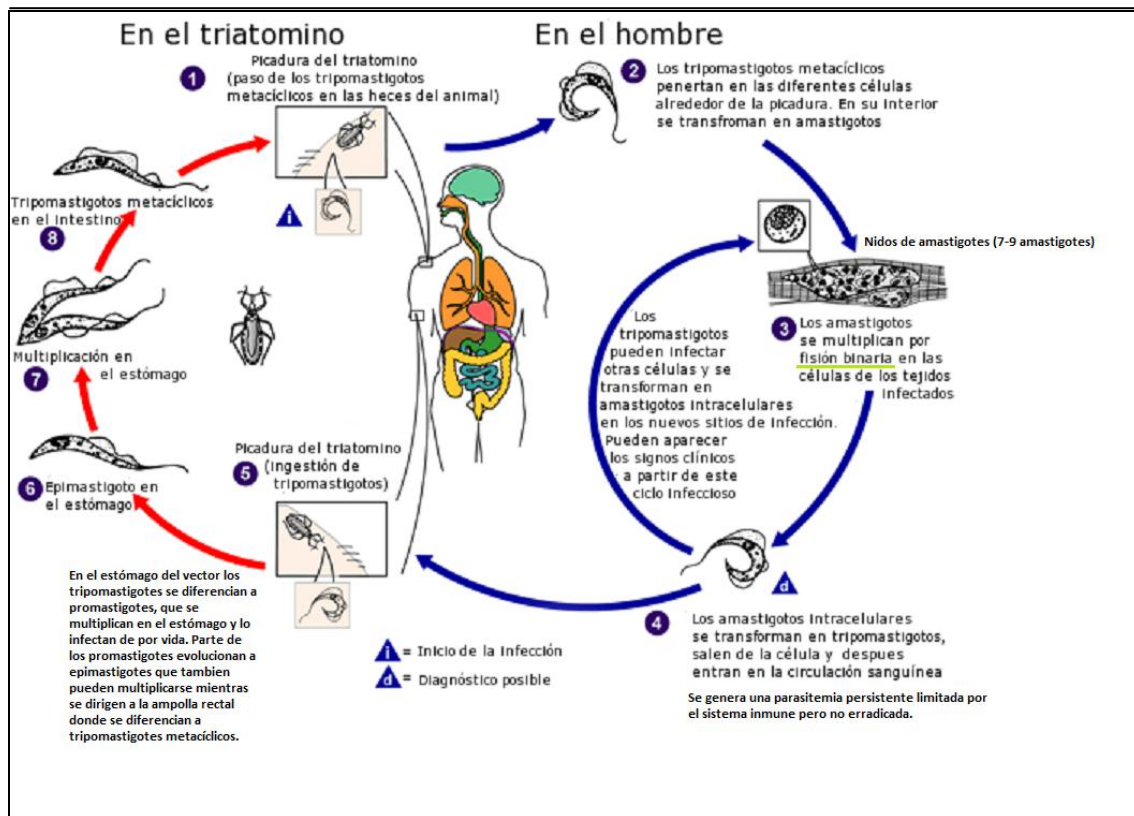
Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Especie: *Trypanosoma cruzi*

El parásito alterna, durante su ciclo de vida natural, entre el hospedador vertebrado y el invertebrado. En ambos se alojan las distintas formas que adopta: mientras que en el insecto (agente vectorial) se encuentra como epimastigote y tripomastigote metacíclico, en el mamífero se observan tripomastigotes sanguíneos y amastigotes intracelulares. Estos estadios evolutivos pueden diferenciarse por sus características morfológicas:

- Epimastigote: forma proliferativa en el intestino de la vinchuca; el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, surgiendo del costado del cuerpo del parásito y dándole a la membrana un movimiento ondulante.
- Tripomastigote: carece de capacidad replicativa. Está presente en la circulación sanguínea del mamífero y en la ampolla rectal de la vinchuca (metacíclico); el flagelo nace por detrás del núcleo y emerge del costado, formando una membrana ondulante de importante extensión, mayor a la del epimastigote.
- Amastigote: forma esférica intracelular replicativa en el mamífero; carece de flagelo.

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.(adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html> 2012³)

El parásito es transmitido por el insecto *Triatoma infestans*, comúnmente llamado en nuestro país "vinchuca". Los insectos parasitados, luego de alimentarse del mamífero, depositan en sus deyecciones las formas infectivas de *T. cruzi*; éstas penetran por la mucosa o las erosiones de la piel, producto del rascado por el escozor que provoca la materia fecal del triatomo. Una vez en el organismo, el parásito es capaz de infectar prácticamente cualquier tipo celular nucleado, aunque suele tener un tropismo diferencial por las células fagocíticas, musculares (corazón, músculo esquelético), sistema nervioso, aparato digestivo y sistema reticuloendotelial. Una vez dentro de la célula, el tripomastigote se diferencia a amastigote, forma en la cual se replica por división binaria, formando "nidos" dentro del citoplasma. Luego de un número de duplicaciones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos, que son liberados a la circulación lisando la célula. Estos parásitos vuelven a infectar células aledañas o distantes, con la posterior multiplicación intracelular de los mismos. El ciclo concluye cuando un triatomo no infectado se alimenta de un mamífero parasitado; en el intestino de la vinchuca los tripomastigotes ingeridos se diferencian a epimastigotes, forma replicativa dentro del insecto^{9,10}.

La principal vía de infección es la vectorial, ya que se informó que el 95% de los individuos que dijeron estar en contacto con vinchucas, tuvieron serología positiva¹¹. Sin embargo, otras vías de infección también son posibles, aunque en menor proporción: la congénita, la transfusional, por trasplante de órganos, la oral y la contaminación accidental. Estas vías no vectoriales cobran relevancia en las ciudades donde, debido a las migraciones internas, se realiza el pasaje del patógeno de un individuo infectado a uno sano, sin intervención de la vinchuca. Debido a estas formas de infección, la migración de personas infectadas plantea un problema de salud pública, no solo para los países endémicos, sino también para aquellos que no registren transmisión vectorial del parásito, por ejemplo, Canadá y Estados Unidos de América¹², como se mencionó previamente.

2. *Curso de la infección por T. cruzi*

Habitualmente, en la enfermedad pueden diferenciarse 3 períodos evolutivos: una etapa aguda, una tradicionalmente considerada indeterminada y una crónica. La primera es generalmente asintomática, aunque en ocasiones puede presentar síntomas y signos clínicos de distinta especificidad, como fiebre elevada y diarrea¹³. En esta etapa en algunos pacientes se observa el característico signo de Romaña (complejo oftalmoganglionar), que consiste en edema bpalpebral unilateral y conjuntivitis, dando la forma de “ojo en compota”, junto con adenopatía satelital. La mayoría de los infectados en etapa aguda son niños menores de 10 años de edad¹⁴; de ellos, una gran proporción desarrollará una forma benigna de la enfermedad, mientras que en un porcentaje reducido se presentará como formas graves tempranas (meningoencefalitis, miocardiopatía).

La segunda etapa es un período asintomático de evolución silenciosa que continúa a la etapa aguda y puede durar décadas. Alrededor del 70% de los pacientes que cursan esta etapa evolucionan de forma favorable y permanecen en este estado hasta el deceso natural. La falta de síntomas específicos evidentes es tan característica que lo único que diferencia a un enfermo de Chagas en esta etapa de un individuo sano, es la serología reactiva¹⁵. Los estudios más frecuentes muestran la falta de evidencia de daño cardíaco, como lo demuestran el electrocardiograma y la radiografía de tórax normales. Sólo estudios complementarios más específicos, como la electrocardiografía de 24 hs (Holter), el ecocardiograma (ECO) y la cámara gamma dan cuenta de las lesiones clínicas de otro modo imperceptibles^{16,17}. Debido a estos estudios, al antecedente endémico/epidemiológico y a la serología positiva es que puede realizarse un diagnóstico efectivo en estos pacientes. En el año 2010 se realizó un consenso en el que participaron la

Sociedad Argentina de Cardiología y un comité de expertos en el cual acordaron la eliminación del término “etapa indeterminada”. La nueva clasificación establece una etapa aguda, con o sin síntomas y una etapa crónica, con o sin patología demostrable¹⁸. A pesar de este nuevo consenso, se sigue utilizando la anterior denominación por simplicidad.

Finalmente, deviene una etapa crónica en la cual, en el 30% de los casos, se desarrolla una importante cardiopatía inflamatoria, con destrucción de células cardíacas seguida de fibrosis, que puede conducir a falla congestiva e incluso la muerte¹⁹. Que un individuo permanezca en etapa asintomática o progrese hacia la miocardiopatía chagásica crónica, parece depender de varios factores: tiempo de exposición al vector en zona endémica, edad, número de re-infecciones, nivel educativo y socio-económico, tipo de actividad laboral, tiempo de evolución de la infección, estado de nutrición y por lo tanto, del sistema inmune^{20,21}, además de las características genéticas del parásito infectante y del hospedador. La patología cardíaca es florida, pudiéndose presentar desequilibrios como arritmias ventriculares graves, trastornos de la conducción eléctrica intraventricular, dilatación, bradicardia por debajo de los 55 latidos por minuto y extrasístoles, todo ello afectando el ritmo y la frecuencia cardíaca^{22,23}. Otra manifestación característica de la etapa crónica es la destrucción neuronal provocada por el parásito; estas lesiones afectan principalmente al sistema nervioso autónomo parasimpático, pudiendo quedar destruidas hasta el 80% de las estructuras nerviosas del corazón²⁴. Esta disautonomía compromete tanto al tejido cardíaco como al músculo liso del sistema digestivo, ocasionando la dilatación de los órganos, característica de la enfermedad²⁵.

3. Diagnóstico de laboratorio de la infección por T. cruzi

Las distintas técnicas que se utilizan para el diagnóstico de la ECh varían según el estadio de la infección en que se encuentre el paciente. En la infección aguda (o en reactivación por inmunosupresión) y congénita, dado que el parásito se encuentra en niveles destacados en forma circulante, éste puede ser visualizado microscópicamente. Entre los métodos parasitológicos de detección directa, el microhematocrito y el Strout²⁶ son los de referencia²⁷. Aunque hay publicaciones recientes sobre el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la detección de ADN del parásito, aún no hay un consenso establecido para ser utilizada en el laboratorio de rutina²⁸. Dentro de los métodos parasitológicos de detección tardía deben mencionarse el xenodiagnóstico y el hemocultivo. Si bien tienen alta sensibilidad y pueden utilizarse en el diagnóstico de la infección aguda o crónica, requieren de una infraestructura compleja y no brindan un resultado inmediato. En la etapa crónica, debido a que la parasitemia es subpatente, se

utilizan métodos de diagnóstico indirectos, basados en la detección de anticuerpos circulantes específicos anti-*T. cruzi*. Las técnicas más frecuentemente usadas son el enzoinmunoensayo (ELISA) convencional o con antígenos recombinantes, la inmunofluorescencia indirecta, la hemaglutinación indirecta y la aglutinación pasiva de partículas²⁹. De acuerdo al criterio de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que un individuo está infectado cuando presenta al menos 2 pruebas serológicas reactivas. En caso de resultados discordantes, deberá realizarse una tercera técnica (Guía de Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes con Enfermedad de Chagas, Programa Nacional de Chagas)

4. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas

En la actualidad, una de las pocas drogas autorizadas disponibles que resulta eficaz para el tratamiento durante la etapa aguda de esta parasitosis, es el benznidazol (*N*-benzil-2-nitroimidazol acetamida, BZ). Este derivado nitroheterocíclico es capaz de reducir la parasitemia hasta niveles no detectables, eliminar los síntomas de la fase temprana y abreviar el curso de la infección³⁰. El mecanismo de acción de la droga reside en la generación de radicales libres producidos durante su metabolismo, afectando las formas intra y extracelulares del parásito³¹. Los metabolitos nitrorreducidos del BZ pueden unirse directa y covalentemente a macromoléculas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, generando un daño irreversible en ellas. El sistema antioxidante de *T. cruzi* se basa principalmente en los tioles tripanotona y glutatión, mientras que carece de otras moléculas como α -tocoferoles, ascorbato, β -carotenos y de enzimas como catalasa y glutatión peroxidasa³². EL BZ, al conjugarse con estos tioles, reduce el contenido final de estas moléculas antioxidantes disponibles, quedando el parásito con una respuesta deficiente ante el estrés oxidativo. El contenido diferencial de tioles en la célula hospedadora y en el parásito es una marca bioquímica distintiva, de la cual depende la eliminación del *T. cruzi* o de la célula infectada.

El otro fármaco autorizado y que se utiliza habitualmente para el tratamiento etiológico de la ECh, es el nifurtimox (NF), un derivado nitrofurano, cuya acción parasiticida es similar a la descrita para el BZ³². En el caso del NF, no hay unión covalente directa entre las especies nitrorreducidas derivadas de la droga y las macromoléculas biológicas, sino que son los radicales del O_2 (peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$)), generados en un ciclo redox, los que dañan irreversiblemente el ADN, proteínas y lípidos. Nuevamente, serán los niveles de las defensas antioxidantes del parásito y la célula hospedadora los que determinen el desenlace a favor de uno u otro. Cabe señalar que se han reportado

aislamientos de *T. cruzi* que no son susceptibles a la acción de la terapéutica parasiticida³³. Frente a esta situación, en los últimos años se ha investigado el potencial tripanocida de numerosos compuestos sintéticos y naturales³⁴, aunque ninguno de ellos ha brindado mejores resultados que BZ o NF.

Durante la fase aguda de la infección, ya sea adquirida por transmisión congénita o vectorial en los primeros años de vida, el tratamiento resulta fundamental, ya que la cura parasitológica asciende prácticamente al 100% de los pacientes tratados³⁵. Se han descrito algunos efectos secundarios luego de la administración del BZ, tanto en pacientes pediátricos³⁶ como adultos³⁷. En su mayoría se trata de trastornos dermatológicos (urticaria), aunque pueden aparecer también vómitos, dolor abdominal y cefalea. Si bien estos eventos pueden registrarse en la población infantil, no justifican la interrupción del tratamiento ya que son fácilmente controlables³⁶. Se ha descrito que la edad del paciente al momento del tratamiento es un factor relacionado con la aparición de estos efectos secundarios. Cuanto menor es la edad, menos eventos adversos y mayor probabilidad de cura. El principal elemento generador de efectos colaterales es la actividad enzimática de nitrorreducción y la generación de radicales libres. Esta actividad es muy baja en niños y adultos jóvenes, lo que puede explicar la menor incidencia de los mismos³⁷. Es por esto que las guías de tratamiento de la OMS aconsejan tratar a todos los niños infectados menores de 14 años³⁸, ya que logrando la cura parasitológica se previene en consecuencia, la progresión de la enfermedad³⁹⁻⁴¹.

En la etapa crónica, en cambio, no hay un criterio globalmente aceptado sobre el tratamiento etiológico de los pacientes. Algunos autores argumentan que la gran cantidad de eventos adversos producto de la medicación no hace tolerable la quimioterapia en adultos⁴². Sin embargo, Alvarez y col. demostraron que el tratamiento con BZ, aún incompleto, producía la seroconversión en el 30% de los pacientes tratados que habían sufrido estos efectos⁴³. Más aún, el grupo que recibió BZ evidenció una mejor evolución clínica. Con estos hallazgos, ha ganado consenso la posibilidad de administrar el tratamiento parasiticida a los pacientes con Chagas en fase crónica indeterminada, con el objetivo de prevenir la aparición de patología, como lo han demostrado los mismos autores con resultados alentadores⁴⁴. Actualmente, se desarrolla un estudio multicéntrico en varios países de Latinoamérica para evaluar la utilidad de la terapéutica parasiticida con BZ en 3000 pacientes adultos con formas leves a moderadas de miocardiopatía chagásica crónica⁴⁵.

Aunque los resultados no son concluyentes, se han descripto algunas consecuencias del BZ sobre la respuesta inmune del hospedador infectado, fundamentalmente en el modelo experimental⁴⁶⁻⁴⁸, aunque también existen observaciones en pacientes⁴⁹⁻⁵². Al respecto, trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que los anticuerpos anti-receptores muscarínicos M2, potencialmente patogénicos, disminuyen luego del tratamiento con BZ cuando se administra a pacientes que cursan la etapa crónica temprana⁵³. Hasta el presente se cuenta con escasa información acerca del potencial efecto modulador de esta droga administrada en la etapa crónica de la enfermedad, sobre mediadores de inmunidad e inflamación.

La estrategia de la OMS para la eliminación de la ECh se basa en el control vectorial, el tamizaje sistemático de bancos de sangre, la detección de la transmisión transplacentaria y el tratamiento de los casos agudos, congénitos y de los niños infectados⁵⁴. Sin embargo, aún se presentan dificultades en la implementación efectiva de las acciones que se llevan adelante en esos campos para combatir la infección por *T. cruzi*. Esta situación conduce actualmente a incrementar el esfuerzo en el desarrollo de nuevas drogas parasitocidas y de vacunas profilácticas y terapéuticas. Tradicionalmente, la exploración de vacunas contra *T. cruzi* se vio fuertemente restringida por el temor de que generaran un efecto contraproducente, idea basada en el concepto de que la ECh tenía en esencia una etiología autoinmune. En los últimos tiempos, se ha reunido evidencia numerosa y sólida que indica que la persistencia del parásito en los tejidos del hospedador es la responsable principal de generar y mantener el proceso inflamatorio patológico (ver ítem 5). Como consecuencia de estos hallazgos, a los que debe sumarse el acceso a las secuencias genómicas y proteómicas del parásito^{55,56}, se impulsó la investigación en vacunas anti-*T. cruzi* como una alternativa para control o tratamiento de la ECh. Así, desde hace dos décadas se vienen realizando diversos estudios que incluyen antígenos nativos y recombinantes, vacunas ADN, parásitos atenuados, múltiples adyuvantes e inmunomoduladores, y estrategias de inmunización, que representan un firme avance en la comprensión de aquellos mecanismos relevantes para la generación de inmunoprotección sin provocar daño tisular^{57,58}. Aunque la vacuna resultante no consiguiera generar una inmunidad esterilizante, de todos modos sería importante que logre reducir significativamente la carga parasitaria en el hospedador inmunizado para interrumpir la transición de infección a enfermedad.

5. Patogénesis de la enfermedad de Chagas

A pesar de su importancia médica, los mecanismos fisiopatogénicos de la ECh no se conocen acabadamente y aún son motivo de controversia. En las formas crónicas, el

número de nidos parasitarios, relativamente escasos en las infecciones humanas, no correlaciona patogénicamente con la intensidad del infiltrado inflamatorio y la fibrosis en el corazón⁵⁹. Por el contrario, es posible también encontrar cierto grado de parasitismo en otros órganos, como el riñón, en ausencia de daño tisular significativo⁶⁰. Al respecto, se han postulado diversas hipótesis para intentar explicar la ocurrencia de lesiones en el miocardio de pacientes en esta etapa de la enfermedad. Entre ellas se incluyen: la persistencia del parásito o sus componentes antigénicos en el sitio de inflamación⁶¹, la denervación del corazón, la afectación de la microcirculación cardíaca⁶² y la existencia de un destacado proceso de autoinmunidad⁶³ e injuria tisular causada por una respuesta inflamatoria exacerbada⁶⁴.

En la actualidad, técnicas como la PCR y la inmunohistoquímica (IHQ) con anticuerpos monoclonales permiten la detección de *T. cruzi* con mayor poder de resolución⁶⁵. Empleando este tipo de técnicas, Tarleton y col.⁶¹, a favor de la primera hipótesis, sostienen que la causa primaria de la enfermedad crónica es la imposibilidad del hospedador de eliminar el parásito, que resulta en un daño tisular generado por la infección y desbalance del sistema inmune⁶⁵. Según este autor, existe una relación directa entre la presencia del parásito y el daño al miocardio. En concordancia con estos resultados, Añez y col. encontraron nidos de amastigotes y un importante proceso inflamatorio en más del 90% de las biopsias endomiocárdicas obtenidas de pacientes chagásicos⁶⁶. La ausencia aparente de parásitos en los sitios de infección informada históricamente puede deberse al uso de métodos de baja sensibilidad, como técnicas histoquímicas.

La disfunción del sistema nervioso autónomo fue demostrada desde la primera descripción de la enfermedad, realizada por el mismo Carlos Chagas⁶⁷. En los últimos tiempos, esta disfunción fue asociada con la patogenia de los principales trastornos cardiovasculares y digestivos. Se ha informado que el *T. cruzi* induce un progresivo bloqueo de los receptores autonómicos o una denervación parcial del corazón, vasos sanguíneos y vísceras digestivas, generando la disautonomía de los órganos en aproximadamente el 30% de los pacientes⁶⁸. Recientemente, Miranda y col. asociaron las arritmias ventriculares a la denervación simpática del miocardio que se observa en la etapa crónica, aun cuando la función cardíaca se encuentra relativamente bien conservada⁶⁹. Se ha descrito que en la denervación del tejido cardíaco están afectados los receptores autonómicos, tanto los adrenérgicos como los colinérgicos muscarínicos⁷⁰. Las alteraciones observadas a este nivel son debidas a la producción de autoanticuerpos capaces de interactuar con estos receptores en la superficie del miocardio⁷¹. Estas inmunoglobulinas actuarían como agonistas produciendo una continua estimulación, con

la consecuente desensibilización de los receptores⁷². Se sugirió que la presencia de estos autoanticuerpos es generada por un mecanismo de mimetismo molecular entre los receptores autonómicos humanos y ciertas regiones de proteínas de superficie de *T. cruzi*⁷³. Asimismo, en el suero de pacientes con Chagas crónico se demostró la presencia de anticuerpos que son capaces de unirse directamente a receptores adrenérgicos nativos⁷⁴. Es la presencia de estos autoanticuerpos y no el título de los mismos que se asocia a la severidad de la enfermedad⁷⁰. A pesar de estas evidencias, no resulta claro aún si la aparición de los autoanticuerpos es causa de la enfermedad o consecuencia de la misma⁷⁵.

El compromiso de la microvasculatura en la enfermedad fue descrito a finales de la década del '50⁷⁶, pero se asoció con la patogenia recién en los años '80- '90^{77,78,79}. Jörg y col. describieron en autopsias de pacientes con miocardiopatía chagásica crónica la presencia de una importante descapilarización miocárdica, con destrucción microfocal extensiva de vasos capilares y la consecuente isquemia, hipoxia y miocitólisis⁶². A pesar de los hallazgos mencionados, éstos resultan insuficientes para ser aplicados a la patogenia como causa dominante.

La hipótesis que involucra a la respuesta inmune como factor patogénico de la miocardiopatía chagásica surge de una aparente contradicción: la virtual ausencia del parásito en el tejido a pesar del intenso infiltrado inflamatorio. Según este punto de vista, las células del sistema inmune que conforman el infiltrado y moléculas solubles liberadas al entorno cumplirían un papel fundamental en la generación del daño al tejido, desencadenando una reacción similar a un proceso autoinmune⁶¹. En la etapa aguda, la respuesta inmune de tipo 1 (TH1, proinflamatoria) es necesaria para controlar el parásito^{80,81}, pero la persistencia de esta respuesta en forma desregulada durante la etapa crónica sería un elemento causante de la patología⁸²⁻⁸⁴. Con esto se evidencia que los mecanismos inflamatorios presentan la dualidad de contribuir tanto a la inmunoprotección frente al *T. cruzi* como al desarrollo de miocardiopatía chagásica crónica. Las células inflamatorias encontradas en los tejidos infiltrados durante esta etapa son principalmente linfocitos T CD8⁺⁸⁵, CD4⁺¹³ y macrófagos⁸⁶. Estas células, al infiltrar los tejidos, liberarán citoquinas (CQ) y quimioquinas (QQ) proinflamatorias que, a largo plazo, generan un daño en el tejido⁸⁷. Entre los factores solubles liberados al medio, se encontrarían también anticuerpos reactivos contra moléculas propias del hospedador, como miosina cardíaca⁸⁸, endotelio, vasos e intersticio^{89,90} y nervios periféricos⁹¹. La unión de estos anticuerpos a antígenos tisulares, sumado a la acción de células T autorreactivas, podría provocar los fenómenos granulomatosos y necróticos que se observan en la enfermedad⁹².

De todas las posibilidades descritas se desprende, entonces, que la patogenia de la miocardiopatía chagásica sería el resultado de la combinación de todas o al menos varias de ellas; ninguna es la causa única ni las hipótesis son mutuamente excluyentes.

6. Respuesta inmune a la infección: generalidades.

Prácticamente todos los mecanismos inmunes efectores conocidos han sido asociados con la resistencia a la infección con *T. cruzi*^{93,80}. En la fase aguda de la enfermedad, se desarrolla una poderosa respuesta defensiva, predominantemente de tipo TH1, gatillada primariamente por el parásito. Esta respuesta de carácter proinflamatorio, se desarrolla gracias a la liberación de CQ clásicas, como el interferón-gamma (IFN- γ)^{94,95}, las interleuquinas (IL)-1 (α y β)⁹⁶ y la IL-6⁹⁷. Asimismo, en los últimos tiempos se identificó un extenso número de estos mediadores, como la IL-12⁹⁸, IL-15⁹⁹, IL-17¹⁰⁰, IL-18¹⁰¹ e IL-23¹⁰² que pueden contribuir con la reacción defensiva. La respuesta celular es igualmente importante, e involucra principalmente la activación de células fagocíticas¹⁰³, de linfocitos T CD8⁺¹⁰⁴, CD4⁺ y células citocidas naturales NK¹⁰⁵. En la fase aguda de la infección, los linfocitos B resultan decisivos para reclutar células T hacia el bazo, generar y mantener la memoria inmunológica T central y efectora, y participar en la inducción cruzada de células T CD8⁺ específicas¹⁰⁶. Los linfocitos B activados por antígenos parasitarios, mediante la liberación de anticuerpos específicos neutralizantes, también aportan a la respuesta protectora¹⁰⁷. Los anticuerpos participan en la eliminación del parásito a través de lisis mediada por complemento, fagocitosis, opsonización y citotoxicidad celular mediada por estas inmunoglobulinas¹⁰⁸.

Los fagocitos, que representan la primera línea de defensa contra la infección, reconocen distintos componentes del parásito a través de sus receptores de superficie (de tipo Toll (TLR), de tipo NOD (NLR), de tipo RIG (RLR), entre otros) para diversas estructuras microbianas, a partir de lo cual se incrementan en número y en actividad. Por ejemplo, se ha descrito que glicolípidos de la membrana del parásito actúan como agonistas de TLR2/6 y TLR4, mientras que secuencias CpG del ADN parasitario son reconocidas por TLR9¹⁰⁹. Esta activación dispara su capacidad tripanocida, que depende de la liberación de especies reactivas del oxígeno¹¹⁰ (ERO) y del nitrógeno¹¹¹. En estas células, la acción de IFN- γ y del factor de necrosis tumoral (TNF) produce una fuerte activación de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), lo que lleva a un incremento en la producción de óxido nítrico (NO) y de la destrucción intracelular de amastigotes. El NO es en gran medida el agente responsable de la actividad tripanocida del macrófago activado. No obstante lo antedicho, también se ha asociado al NO con procesos patogénicos¹¹². Por otra parte, el NO ejerce un importante efecto regulador sobre

distintos aspectos de la inmunidad innata y adaptativa (balance TH1/TH2, proliferación de células T reguladoras, migración y apoptosis de células T, producción de quimioquinas, expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II e IL-12 en células presentadoras de antígenos, expresión de moléculas de adhesión en linfocitos, etc.)¹¹³.

En células fagocíticas, el proceso de mayor importancia cuantitativa para la destrucción de los distintos estadios de *T. cruzi* es el mecanismo dependiente del oxígeno y mediado por peroxidasas. Ya desde la etapa temprana inicial de la infección se generan ERO que resultan citotóxicas para el parásito, carente o deficiente en enzimas que permitan metabolizarlas¹¹⁴. Las moléculas involucradas son el H₂O₂, O₂^{•-} y el radical [•]OH. La liberación prolongada de estos mediadores, basada principalmente en una disfunción mitocondrial, lleva al tejido a un estado irreversible de estrés oxidativo, condición que se observa en los corazones de pacientes chagásicos crónicos¹¹⁵.

Tarleton y col.¹¹⁶ evidenciaron que las células T CD4⁺ con perfil TH1 son de importancia para controlar la infección, mientras que las de perfil TH2 contribuyen a la persistencia del parásito y a incrementar la severidad de la patología. Los linfocitos CD8⁺ y las células NK, a su vez, pueden ejercer su efecto mediante la actividad citotóxica, mediada fundamentalmente por perforina y granzima B, y/o su capacidad de producir IFN- γ ; estas actividades celulares son dependientes de la IL-12 liberada por células fagocíticas¹¹⁷. Las células T CD8⁺ generadas por la infección en su mayor parte poseen un receptor T de superficie con cadenas $\alpha\beta$; sin embargo, una reducida subpoblación de células T con receptor compuesto por cadenas $\gamma\delta$ también participa de la inmunidad innata que favorece al desarrollo de la respuesta adaptativa TH1 y la resistencia frente a *T. cruzi*¹¹⁸.

La respuesta inmune anti-*T. cruzi* involucra además a las células NK con restricción por CD1d (NKT), y células reguladoras dendríticas (DCreg) y con fenotipo T (Treg). La acción de la población celular NKT contribuye a restringir el nivel de parasitemia y favorece la generación de anticuerpos contra antígenos clave del parásito¹¹⁹. La interacción entre *T. cruzi* y células presentadoras profesionales de antígenos, a su vez, lleva a una modulación diferencial de la expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y co-estimuladoras, mayormente dependiente de la virulencia de la cepa de parásito¹²⁰. Asimismo, se ha demostrado que los tripomastigotes son capaces de inducir la generación de DCreg caracterizadas por un bajo grado de maduración y por la hipersecreción de IL-10 y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)¹²¹. Los linfocitos Treg constituyen una subpoblación celular T CD4⁺ que

regula las funciones del sistema inmune, inhibiendo la proliferación de linfocitos T y la producción de CQ proinflamatorias, además de estar involucrados en la tolerancia contra antígenos propios¹²², control de las enfermedades alérgicas y regulación de la respuesta a patógenos^{123,124}. Existen 2 clases importantes de Treg dentro de la subpoblación CD4⁺: CD25⁺Foxp3⁺ y Treg tipo I, las que difieren en características biológicas incluyendo el perfil de CQ, marcadores celulares y mecanismos de supresión inmune¹²⁵. En la etapa aguda experimental de la ECh, los linfocitos Treg CD4⁺ CD25⁺Foxp3⁺ resultaron claves para controlar la inflamación cardíaca temprana, mejorando la supervivencia del hospedador, pero no así para reducir la parasitemia¹²⁶. De la misma forma, recientemente se ha comprobado que, en la etapa crónica, la frecuencia de estas células se encuentra aumentada en pacientes en estadio indeterminado, en correlación con una mejor función cardíaca¹²⁷. Se cree entonces que las células Treg tienen un importante papel en la regulación de la respuesta inmune exacerbada, modulando el ambiente de CQ potencialmente patogénicas generadas durante la infección con *T. cruzi*.

En la mayoría de los casos, la autorregulación fisiológica de la respuesta TH1 llevaría al establecimiento de un equilibrio duradero entre el hospedador y el parásito. El éxito del desarrollo de una respuesta protectora podría en parte deberse a una combinación de factores: la producción temprana de IFN- γ , inducida por la presencia de IL-18 pero en ausencia de IL-13, favorecería la resistencia al parásito en infecciones experimentales¹⁰¹. Dicho control sería llevado a cabo principalmente por la disminución de la carga parasitaria y de los mediadores asociados a la respuesta TH1. Se ha documentado también la producción de CQ antiinflamatorias TH2, como la IL-4¹²⁸, IL-10¹²⁹, IL-13^{130,131} y TGF- β ⁸² en la etapa inicial de la infección, aunque en forma atenuada. Esta última respuesta se torna preponderante a medida que decae la etapa aguda, contrabalanceando la actividad TH1 y permitiendo la continuidad de la infección hacia una fase crónica. Otras CQ como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el TNF¹³² pueden ser secretadas tanto por células TH1 como TH2. Es así, entonces, que el hospedador desarrolla una inmunidad "concomitante", capaz de resistir la reinfección pero no de eliminar por completo al parásito.

Durante el estadio crónico, la mayoría de los pacientes evidencian una consistente respuesta inmune específica, tanto humoral como celular. Una vez superada la etapa aguda, y ante la virtual ausencia de parásitos en la sangre, la respuesta TH1 decrece, aunque algunas CQ proinflamatorias pueden permanecer en niveles circulantes elevados, inclusive durante décadas. Al respecto, algunos de estos mediadores se hallan incrementados en la etapa crónica de la enfermedad, con y sin sintomatología asociada. Se han detectado elevados niveles de TNF- α en el suero de pacientes adultos que

presentaban una marcada miocardiopatía dilatada¹³³. Este entorno de CQ está acompañado por la inmunidad celular, siendo la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ la más representada en el infiltrado del miocardio; en el modelo murino de infección estas células perduran como poblaciones de memoria independientes del antígeno¹³⁴, aunque en el ser humano todavía es controversial el mecanismo por el que estas células permanecerían activas aún en etapa crónica. Si bien se ha determinado la presencia de IL-4 en esta etapa de la enfermedad, se ha asociado la patología casi exclusivamente con la desregulación de la respuesta TH1 proinflamatoria⁸². En este sentido, en pacientes crónicos se ha identificado una subpoblación celular T CD8⁺ diferenciada, productora de IFN- γ , directamente vinculada con la progresión de la enfermedad¹³⁵.

Desde hace unos pocos años, el paradigma de las dos únicas poblaciones linfocitarias inmunológicamente dicotómicas, TH1 y TH2, dejó de tener vigencia. Nuevas evidencias en modelos experimentales demostraron un nuevo linaje de linfocitos T cooperadores, denominado TH17. Esta población presenta rasgos distintivos respecto de las ya mencionadas, como el patrón de CQ que produce, confiriéndole un perfil funcional propio durante la respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas activadas por la vía de los TLR producen TGF- β , IL-6 e IL-23 induciendo la proliferación y activación de linfocitos CD4⁺ con características de TH17¹³⁶. Estas células, a su vez, secretan IL-17A e IL-17F, promoviendo el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares en infecciones agudas. La IL-17 también induce la producción de IL-6 y TNF- α , que sustentan a los linfocitos TH17 que participan en las lesiones crónicas de patologías inflamatorias autoinmunes¹³⁷ o infecciosas como la causada por *Leishmania major*¹³⁸. Sin embargo, en la ECh los altos niveles de IL-17 controlan la miocarditis en la fase aguda⁸³ y se asocian con una mejora de la función cardíaca en la etapa crónica¹³⁹, probablemente contrabalanceando la respuesta inflamatoria. Otros autores también destacan el papel de la IL-17 en la resistencia a la infección por *T. cruzi*¹⁴⁰.

7. Papel dual de citoquinas en la respuesta inflamatoria generada por *T. cruzi*

Las CQ tienen vital importancia en el establecimiento de la respuesta inmune contra cualquier agente patógeno. Ellas determinan el inicio, la duración y los actores del sistema inmune que estarán involucrados en la defensa del hospedador. Como se ha mencionado, en algunos casos la liberación desregulada de estas CQ inflamatorias como parte de la respuesta frente al parásito podría generar serias consecuencias en la inducción y/o amplificación del daño tisular, contribuyendo a la patogénesis de la miocardiopatía chagásica. En el curso de la ECh, una doble funcionalidad protectora/patogénica se pone de manifiesto en la actividad de IFN- γ y TNF- α .

El IFN- γ es la CQ que más se encuentra implicada tanto en la resistencia a la infección, donde representa un elemento decisivo durante la etapa temprana, como en la reacción inflamatoria concomitante. Durante la etapa aguda de la ECh humana se han encontrado niveles elevados de este mediador en pacientes tratados y curados, mientras que en la etapa crónica, en algunos estudios su incremento se asoció con la patología^{127,141}. En pacientes con miocardiopatía chagásica crónica se ha detectado una mayor producción de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica¹⁴¹, inducción de genes regulados por IFN- γ en tejido cardíaco¹⁴², desbalance IFN- γ /IL-10 circulantes¹⁴³ y densidad de células productoras de esta CQ en ventrículo izquierdo⁸², en comparación con lo observado en la infección asintomática por *T. cruzi*. Se ha comprobado que deficiencias tanto en la producción endógena de IFN- γ como en la expresión del receptor para esta CQ no permiten la sobrevida del hospedador infectado con *T. cruzi*^{144,145}. Por otra parte, una producción disminuida de IFN- γ , en mujeres embarazadas infectadas crónicamente con *T. cruzi*¹⁴⁶, está asociada a un incremento en la carga parasitaria y una deficiente respuesta inmunológica periférica materna, con el consiguiente aumento de riesgo de transmisión transplacentaria de la infección¹⁴⁷. Resulta claro, entonces, que el nivel de IFN- γ secretado y su cinética de liberación son decisivos para atribuirle un papel protector o patogénico en la enfermedad.

El TNF- α es otro claro ejemplo relacionado tanto con el daño tisular en el curso de la infección por *T. cruzi* como con la resistencia al parásito. Tal como ocurre con IFN- γ , todavía son controvertidos los resultados encontrados en pacientes con cardiopatía chagásica en cuanto a la expresión y funcionalidad de esta CQ. Algunos autores argumentan que un incremento en los niveles circulantes de TNF- α estarían relacionados con la severidad de la miocardiopatía^{133,148,149}; asimismo, otros investigadores hallaron una correlación entre la existencia de disfunción ventricular y una mayor concentración plasmática de TNF- α en pacientes con cardiopatía chagásica crónica¹⁵⁰. Estudios genéticos sobre pacientes con cardiopatía chagásica severa, asociaron un polimorfismo en el promotor del gen de TNF- α con mayor probabilidad de agravamiento y una reducida sobrevida, comparado con individuos sanos o con ECh asintomática¹⁵¹⁻¹⁵³. Otras investigaciones no verificaron dicha vinculación¹⁵⁴. De acuerdo con esto, la sobreexpresión local de TNF- α en estudios experimentales con ratones, comprobó su capacidad para acelerar la muerte de los animales infectados con *T. cruzi*, debido a la falla cardíaca congestiva¹⁵⁵. Además, el bloqueo farmacológico *in vivo* de la actividad de esta CQ logró reducir la intensidad de la miocarditis chagásica experimental¹⁵⁶. Sin embargo, por otro lado se ha informado que ratones genéticamente modificados que carecen del gen del receptor tipo I para TNF- α sobrevivieron por menos tiempo a la infección que los salvajes, asignándole a esta CQ un rol importante en el control del

parásito¹⁵⁷. En este sentido, se ha observado que un aumento en la relación TNF- α /receptor soluble circulante se asocia al incremento del grado de caquexia y probabilidad de mortalidad en los animales infectados¹⁵⁸.

8. Factor de inhibición de la migración de macrófagos

El factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF), fue considerado históricamente como un producto de los linfocitos T activados capaz de inhibir la migración al azar de los macrófagos *in vitro*¹⁵⁹. Actualmente, se sabe además que se expresa constitutivamente en una gran variedad de tipos celulares (macrófagos, linfocitos T activados, eosinófilos, células granulosas del ovario, células de Leydig en testículo, endoteliales, epiteliales) y tejidos (glándulas pituitaria y adrenal, islotes pancreáticos, miocardio, sistema nervioso central)¹⁶⁰. Ha sido descrito como un potente mediador proinflamatorio en la respuesta inmune innata y adaptativa, con capacidad de inducir y aumentar la expresión de CQ de la respuesta TH1¹⁶¹, y moléculas de adhesión intercelular -como la molécula de adhesión a la célula vascular I (VCAM-I) y la molécula de adhesión intercelular I (ICAM-I)¹⁶², además de poseer una actividad enzimática de isomerasa-tautomerasa¹⁶³. También juega un papel clave en la interfase inmuno-neuroendócrina, ya que las células de la glándula pituitaria anterior liberan MIF al ser estimuladas con lipopolisacárido bacteriano durante la infección experimental con *Escherichia coli* o por la inducción de un estado de estrés, cumpliendo un rol modulador en el proceso inflamatorio y contrarrestando los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides¹⁶⁴. Cabe destacar que los niveles de MIF son regulados a su vez positivamente por bajos niveles de glucocorticoides¹⁶⁵. MIF es capaz de unirse a un complejo receptor multicomponente, constituido por CD74, CD44 y los receptores de quimioquinas CXCR2 y CXCR4, desencadenando señales de activación^{166,167}. Al producirse la unión entre el ligando y el complejo receptor, MIF ingresa a la célula activada mediante un proceso endocítico dependiente de clatrina y dinamina, lo cual lleva a estimular vías de señalización endosomal¹⁶⁸. Se desconoce en detalle el mecanismo de acción de MIF, si bien se ha descrito una variedad de vías intracelulares, entre ellas las mediadas por Ca²⁺, AP-1, Akt y p53, activadas con destinos diversos¹⁶⁹⁻¹⁷².

Una función conocida de esta CQ es la de activar el receptor TLR de tipo 4 (TLR4), que lleva a su vez a la activación de las vías del factor nuclear κ B (NF- κ B) y de las quinasas de proteínas dependientes de mitógeno 8-10 (MAPK 8-10), induciendo así la expresión de iNOS y de CQ proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IFN- γ ¹⁷³. Otro destino intracelular dependiente de MIF es el de la muerte celular programada o

apoptosis, en el que se observan situaciones casi antagónicas. El efecto de MIF resulta ser fuertemente dependiente del tipo celular involucrado: la vía mitocondrial (intrínseca) está afectada tanto cuando desempeña un papel anti-¹⁷⁴ como pro-apoptótico¹⁷⁵. Llamativamente, en ambas situaciones también está involucrada la inhibición y activación de la caspasa 3 efectora, respectivamente. En el primer caso, MIF es capaz de inhibir la apoptosis en neutrófilos retrasando el clivaje de Bid y Bax, ambas proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. En el segundo, MIF induce la muerte celular programada de cardiomiocitos de rata neonatales reduciendo la expresión del gen *bcl-xl*, de la familia de Bcl-2, con efecto anti-apoptótico. Si bien históricamente ha sido tema de largo debate, recientemente se ha descrito que tanto las formas intra como extracelulares de *T. cruzi* inducen la apoptosis de cardiomiocitos cuando éstos son infectados¹⁷⁶. No se ha investigado aún si MIF podría tener algún efecto sobre la muerte celular programada de las células cardíacas infectadas.

Existe una clara diferencia entre MIF y el resto de las CQ pro-inflamatorias: MIF se encuentra pre-sintetizado tanto en las células de la glándula pituitaria como en los monocitos/macrófagos. En respuesta a una variedad de estímulos, MIF es liberado rápidamente desde los sitios de almacenamiento intracelular en donde se encuentra preformado, a través de una vía de exportación dependiente de un transportador ABC¹⁷⁷. El resto de las CQ deben ser sintetizadas *de novo*; ésto sugeriría un importante papel de MIF en la respuesta inmediata a infecciones¹⁷⁸. Una vez liberado, MIF actuaría activando o promoviendo la expresión de CQ proinflamatorias, como TNF- α e IFN- γ , entre otras¹⁷⁹. Asimismo, MIF induce la generación de ROS y resulta esencial para un normal influjo leucocitario hacia los tejidos inflamados¹⁸⁰⁻¹⁸².

Desde hace unos pocos años, MIF es considerado un mediador crítico de la respuesta inmune temprana a diferentes infecciones por protozoos parásitos¹⁸³. Particularmente en la ECh, la inducción precoz de MIF en tejidos blanco del hospedador ha sido señalada como un evento crucial para la resistencia a la infección aguda por *T. cruzi*^{184,185}, si bien no se describe con precisión su mecanismo efector. Como ya se ha apuntado para otras CQ que juegan un rol dual durante el curso de la infección¹⁸⁶, MIF también está involucrado en la fisiopatología de enfermedades parasitarias, como malaria, toxoplasmosis y leishmaniasis visceral¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. Por otro lado, se detectaron concentraciones séricas elevadas de MIF en muchas patologías infecciosas e inflamatorias, lo que avala la hipótesis de la participación de esta CQ en su patogénesis¹⁹¹⁻¹⁹⁵. Además, MIF ha sido asociado a un empeoramiento de ciertas enfermedades y la neutralización de esta CQ mejora la evolución clínica del paciente¹⁹⁶⁻¹⁹⁹. Más allá de estos antecedentes, cabe consignar que, previo a nuestro trabajo, no

existen datos en la literatura acerca del rol de MIF en el establecimiento de la miocardiopatía chagásica crónica.

9. *Quimioquinas y sus receptores en la enfermedad de Chagas.*

El término "quimioquina", una abreviatura de "citoquina quimiotáctica", fue creado para describir una familia de alrededor de 50 proteínas relacionadas, de bajo peso molecular (8-12 kDa), efectivas para inducir la quimiotaxis de leucocitos *in vitro* y su reclutamiento *in vivo* (Tabla I). Las QQ juegan un rol decisivo en el influjo celular al sitio de inflamación, y la consiguiente activación, de distintas subpoblaciones de leucocitos; modulan la proliferación de células T, la diferenciación de la respuesta TH1/TH2 y la resistencia a infecciones²⁰⁰. Su extenso espectro de actividad incluye también la activación de integrinas durante las interacciones leucocito-endotelio, la estimulación de varias funciones leucocitarias (degranulación, liberación de mediadores lipídicos), angiogénesis y angiostasis^{201,202,203}. Así, el sistema de QQ asegura un abanico de actividades relacionadas con el tráfico de las células, la adhesión de las mismas al endotelio del sitio de la reacción y la consecuente respuesta defensiva, de una manera apropiada, espacial y temporalmente.

A nivel estructural, las QQ usualmente contienen cuatro residuos de cisteína y están subdivididas en cuatro familias (CC, CXC, CX₃C y C) en base a los arreglos de los dos residuos de cisteínas en el extremo amino terminal de la molécula. La mayoría de las QQ pertenecen a las dos primeras familias y han generado mucho interés a partir de los hallazgos en modelos experimentales de patologías inflamatorias²⁰⁴. Las QQ de la familia CC incluyen miembros como CCL2/MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1), CCL3/MIP-1 α (proteína inflamatoria de macrófagos 1 α), CCL4/MIP-1 β (proteína inflamatoria de macrófagos 1 β) y CCL5/RANTES (proteína regulada por activación, secretada y expresada en células T normales). Las QQ de la familia CXC incluyen a CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG (monoquina inducible por IFN- γ) y CXCL10/IP-10 (proteína inflamatoria 10). La actividad biológica de las QQ está mediada por su interacción con receptores presentes en la membrana celular, constituidos por siete α hélices transmembrana y asociados a proteína G²⁰². Los mismos se encuentran anclados en la superficie de varios tipos celulares, incluyendo linfocitos, macrófagos, granulocitos y células no hematopoyéticas, observándose la mayor variedad de repertorio en las células T²⁰⁵. Los receptores para QQ (RQQ) reciben su nombre de acuerdo a los ligandos que unen: CCR para las QQ CC, CXCR para las QQ CXC, etc. A su vez, CCR2, CCR5, y CXCR3 son incluidos dentro de la categoría de receptores tipo I, ya que sus ligandos (CCL2 para

CCR2, CCL3, CCL4, CCL5 para CCR5, y CXCL9, CXCL10 para CXCR3) son QQ inducidas preferentemente en la respuesta TH1.

Tabla I: Familias CC y CXC de Quimioquinas y sus Receptores.

Nombre sistemático	Ligando	Receptor
Familia CC		
CCL1	I-309	CCR8
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	Desconocido	Desconocido
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	CCR3
CCL9/10	Desconocido	Desconocido
CCL11	Eotaxina	CCR3
CCL12	Desconocido	CCR2
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	CCR1
CCL15	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 δ	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4/LEC	CCR1
CCL17	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK1/PARC AMAC-1	Desconocido
CCL19	MIP-3 β / ELC/ exodus-3	CCR7
CCL20	MIP-3 α / LARC/ exodus-1	CCR6
CCL21	6Ckine/SLC/ exodus-2	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxina-2	CCR3
CCL25	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	CCR10
Familia CXC		
CXCR1	GRO α / MGSA- α	CXCR2, CXCR1
CXCR2	GRO β / MGSA β	CXCR2
CXCR3	GRO γ / MGSA - γ	CXCR2
CXCR4	PF4	Desconocido

CXCR5	ENA-78	CXCR2
CXCR6	GCP - 2	CXCR1, CXCR2
CXCR7	NAP - 2	CXCR2
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG	CXCR3
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	CXCR3
CXCR12	SDF -1 α / β	CXCR4
CXCR13	BLC/ BCA -1	CXCR5
CXCR14	BRAX/ bolequina	Desconocido
CXCR15	Desconocido	Desconocido

Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, la síntesis de QQ en miocardio y células inmunes es inducida esencialmente por componentes del parásito presentes en el tejido infectado²⁰⁶, contribuyendo activamente a la respuesta defensiva del hospedador. La inducción y el mantenimiento sostenido de la expresión de estos mediadores y de sus receptores estarían relacionados con la patogénesis de la ECh²⁰⁷. Tanto el IFN- γ como el TNF- α secretados durante la primera etapa de la infección, pueden regular el nivel de expresión de QQ en leucocitos y células cardíacas infectadas¹⁵⁷. Los miocardiocitos y los macrófagos en contacto con *T. cruzi* producen QQ como CCL3, CCL4, CCL5 y CXCL9; a través de estos mediadores, estas células podrían estimularse de una forma autócrina, liberando NO y destruyendo al patógeno^{208,209}. Más aún, algunas moléculas derivadas del parásito, como mucinas ancladas a membrana de *T. cruzi* a través de glicosilfosfatidilinositol y ácidos nucleicos, también son capaces de inducir esta misma regulación positiva en células fagocíticas^{210,211}. En trabajos previos, se ha comprobado que QQ tales como CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 y CXCL10, se hallan presentes en tejido cardíaco de ratones infectados por *T. cruzi*⁸⁶, desde la etapa aguda hasta entrada la etapa crónica. Más recientemente, se verificó que CCL2 contribuye al control de la carga parasitaria tisular mediante la regulación de la distribución, composición celular y estado de activación del infiltrado inflamatorio en miocardio durante la infección temprana²¹². En un modelo experimental de infección aguda por *T. cruzi*, nuestro grupo ha podido comprobar la contribución de CCL3 al proceso inflamatorio que acompaña la ECh, verificándose una reducción del daño tisular mediante el bloqueo *in vivo* de esta QQ con un anticuerpo específico²¹³. Coincidentemente, Bilate y col.²¹⁴ encontraron una expresión aumentada de ARN mensajero para CCL3 en ventrículo izquierdo en relación con la gravedad de la infección reciente. Tal como ocurre en diversos procesos inflamatorios²¹⁵, la expresión de los RQQ también se encuentra aumentada durante la primoinfección, predominantemente en linfocitos y macrófagos. El CCR5, por ejemplo, parece ser

determinante a la hora de controlar la infección, particularmente a nivel de mucosas²¹⁶, pero no en el mantenimiento de la miocarditis a largo plazo²¹⁷. Este receptor sería uno de los principales responsables de la migración selectiva de células T CD8⁺ hacia el tejido cardíaco afectado, ya que estas células expresan CCR5 en su superficie muy tempranamente en el curso de la infección con *T. cruzi*^{206,218}. Otro receptor cuyo nivel de expresión celular se eleva en respuesta a la infección chagásica es CXCR3²¹⁹. Es interesante destacar que el parásito a través de la actividad de sus cisteín proteasas, como la cruzipaina, posee la capacidad de clivar QQ dando como producto antagonistas de las mismas e inhibiendo así la respuesta inmune inflamatoria del hospedador²²⁰.

Durante la etapa crónica los mecanismos inmunopatogénicos también contribuirían con el estímulo antigénico para sostener y modular la inducción de QQ gatillada por *T. cruzi*²⁰⁶. Se detectó un alto nivel de expresión génica de QQ ligadas a respuesta TH1 asociado con miocarditis y fibrosis en corazón de animales con Ech crónica experimental^{221,222}. Así mismo, estudios poblacionales realizados en pacientes de Brasil y Colombia con miocardiopatía chagásica crónica han evidenciado que genotipos ligados a bajo riesgo en los genes de CXCL9 y CXCL10 modulan la expresión de QQ y el grado de inflamación en miocardio, mientras que la ocurrencia de polimorfismo en el gen de CCR5 se asocia con el desarrollo de formas severas de cardiopatía^{207,223}. Si bien se ha descrito una marcada expresión de QQ inducibles por IFN- γ en los sitios de inflamación cardíaca poblados por células T CD4⁺ y CD8⁺, no se ha completado aún la identificación de las subpoblaciones leucocitarias implicadas en la producción local de cada uno de los distintos mediadores. En relación con esto, Gomes y col.²¹⁹, asociaron la presencia de RQQ de respuesta TH1, como CCR5 y CXCR3, con células productoras de IFN- γ , pertenecientes a la subpoblación CD8⁺. El receptor CXCR3, asociado con CCR5 y células productoras de IFN- γ ó TNF- α , presentó niveles incrementados de expresión en leucocitos circulantes de pacientes con Ech con cardiopatía dilatada, comparado con aquéllos que cursaban una patología moderada²¹⁹. En coincidencia con este trabajo, Talvani y col. hallaron una correlación entre la expresión de CCR5 en células T de sangre periférica y la severidad de la miocardiopatía en pacientes con Ech crónica^{219,224}. Estudios realizados en pacientes con infección asintomática mostraron frecuencias elevadas de mutaciones puntuales en el promotor del gen de CCR5, asociadas con una baja expresión del mismo en células T CD8⁺, en comparación con lo observado en pacientes con cardiopatía^{225,226}. Este RQQ fue hallado en la población linfocitaria CD8⁺ predominante en el infiltrado de miocardio, tanto de pacientes²²⁷ como de ratones crónicamente infectados²²⁸. Estudios experimentales sobre cepas de ratones salvajes y deficientes para este receptor (CCR5 -/-) han intentado esclarecer la función de CCR5, tanto en el establecimiento como en el desarrollo y mantenimiento de la miocardiopatía chagásica²²⁸.

Ratones CCR5 -/- no sólo mostraron parasitemias y parasitismos cardíacos más elevados, comparados con los salvajes, sino también reducidos infiltrados inflamatorios, lo que sugeriría que CCR5 juega un rol regulatorio en este proceso. Es interesante destacar que, si bien CCR5 ha probado contribuir al control de la replicación del parásito, al desarrollo de la respuesta inmune protectora y al establecimiento inicial de la miocarditis, no estaría involucrado en el mantenimiento de la inflamación en el miocardio, debido a que, a pesar de la elevada expresión del RQQ durante la fase crónica, el nivel de inflamación de los ratones CCR5 -/- fue equivalente al de los salvajes²¹⁷. Estos autores han demostrado efectos similares a los descritos para CCR5, con el receptor CCR2²²⁹. Por otro lado, el bloqueo temprano de la actividad de los RQQ como CCR5, utilizando antagonistas específicos, puede ser de interés terapéutico para el tratamiento de la inflamación asociada a la patogénesis de la enfermedad de Chagas, sin afectar los mecanismos inmunes de control sobre el parásito²³⁰. Sin embargo, hasta el presente su aplicación experimental ha llevado a resultados contradictorios^{231,232}.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo General

Examinar la contribución de distintos mediadores inflamatorios (citoquinas, quimioquinas y sus receptores específicos) a la inmunopatogénesis de la miocardiopatía chagásica y evaluar el efecto modulador que el tratamiento etiológico con benznidazol pudiera ejercer sobre estos mediadores y la patología inflamatoria.

Objetivos Específicos

Determinar el papel de la citoquina proinflamatoria MIF y sus mecanismos de acción durante la fase temprana de la infección con *T. cruzi*.

Investigar su eventual rol en los mecanismos de respuesta inflamatoria generados a lo largo del estadio crónico de la infección parasitaria, tratando de determinar la implicancia de MIF en el desarrollo de la patología cardíaca.

Explorar el entorno inflamatorio que acompaña a MIF en ambas etapas, haciendo foco en la caracterización de los leucocitos que infiltran el miocardio de los ratones crónicamente infectados.

Durante esta fase, estudiar la potencial función regulatoria que pudiera ejercer MIF sobre la apoptosis de cardiomiocitos infectados, proceso asociado al establecimiento y la progresión de la miocardiopatía chagásica.

Conociendo la controversia que genera el tratamiento etiológico durante el período crónico, y asumiendo un posible efecto inmunomodulador como consecuencia del mismo, verificar si la administración de benznidazol provoca algún impacto sobre la inducción de MIF y la patología inflamatoria en el hospedador con infección prolongada.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Ensayos *in vitro*

1.1. Cultivo de la línea celular HL-1 de cardiomiocitos murinos

La línea celular HL-1 de cardiomiocitos murinos²³³ fue cedida gentilmente en el pasaje 37 por el Dr. Mariano Levin, del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET). Previo a la siembra de las células, se prepararon frascos de cultivo de 25 cm² de superficie cubiertos con gelatina al 0,02% y fibronectina al 0,5% por 24 hs. Las células HL-1 se sembraron en 4 ml de medio Claycomb (Sigma-Aldrich, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos (SFB), 200 UI/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomycin y L-glutamina 2 mM, y se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Para su conservación a largo plazo, las células fueron resuspendidas en 95% SFB con 5% dimetilsulfóxido (DMSO) y almacenadas en N₂ líquido.

1.2. Cultivo de la línea celular Vero de fibroblastos de mono

La línea celular Vero de fibroblastos de riñón de mono verde africano²³⁴ fue sembrada en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie que contenían 4 ml de medio RPMI-1640 (Invitrogen, Life Technologies, EEUU) suplementado con 10% de SFB, 200 UI/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomycin y L-glutamina 2 mM (RPMI completo). Se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Para su conservación a largo plazo, las células fueron resuspendidas en 90% SFB con 10% DMSO y almacenadas en N₂ líquido.

1.3. Cultivo de la línea celular de macrófagos murinos J774

La línea celular J774 de macrófagos murinos²³⁵ fue cultivada en idénticas condiciones a las descritas en el ítem 1.2.

1.4. Cultivo de tripomastigotes de *T. cruzi*

Para el cultivo de los parásitos, se requirieron fibroblastos de la línea celular Vero crecidos en un 75% de confluencia de modo de evitar el desprendimiento de los mismos una vez infectados con los tripomastigotes. Las células Vero fueron infectadas (10

parásitos/célula) con formas tripomastigote de la cepa Tulahuén²³⁶ obtenidas de sangre de ratón con parasitemia elevada, y mantenidas en cultivo por 24 hs a 37°C y 5% de CO₂ para posibilitar la internalización del *T. cruzi*. Luego, se retiró el sobrenadante que contenía los parásitos libres y se lavaron las células con medio RPMI. Un control diario bajo el microscopio permitió observar la evolución de las células infectadas. Al cabo de 5 días, los tripomastigotes liberados al medio fueron cosechados y utilizados para infectar nuevos cultivos celulares. Para la conservación a largo plazo, los parásitos fueron recogidos del sobrenadante, centrifugados a 3.200 rpm y resuspendidos en 70% de medio RPMI, 20% de SFB y 10% de DMSO, para su posterior almacenamiento en N₂ líquido.

1.5. Ensayos de actividad de MIF sobre macrófagos

Macrófagos J774 fueron sembrados en placas de cultivo Lab-tek® (Nunc, EEUU) de 8 pocillos a razón de 1x10⁵ células/pocillo.

Para estudiar el efecto de MIF a corto plazo, las células fueron incubadas por 2 hs en presencia de concentraciones crecientes de MIF recombinante (MIFr; 100, 500 y 1.000 ng/ml). Se utilizó MIFr humano (R&D Systems, EEUU) ya que presenta un 90% de homología con la proteína murina y es activo sobre células de ratón^{237,238}. Luego del tratamiento, los macrófagos fueron lavados e infectados por 2 hs con tripomastigotes de cultivo en una relación parásito/célula de 10:1.

Para analizar el efecto de MIF a largo plazo (por sí solo y en cooperación con IFN-γ), los macrófagos fueron pre-incubados en ausencia o presencia de IFN-γ murino recombinante (1 μg/10⁶ células, Pierce, Thermo Scientific, EEUU) por 1 h y luego tratados durante 72 hs con MIFr en las mismas concentraciones descritas en el párrafo anterior. Cumplido ese tiempo, las células fueron infectadas por 2 hs con *T. cruzi*, en la proporción parásito/célula indicada. Finalmente, se retiró el sobrenadante con los tripomastigotes no internalizados y se mantuvieron las células en cultivo por 48 hs adicionales.

En ambos ensayos, como control sin estímulo se utilizaron células infectadas que no recibieron tratamiento con MIFr. Al finalizar cada uno de los esquemas de tratamiento, los macrófagos fueron fijados por 30 min con formaldehído al 4% en buffer salino PBS, pH 7,2, y luego teñidos con Giemsa (dilución [dil] 1/5 en agua) por 30 min. Mediante observación microscópica se determinó el % de células infectadas y el N°

amastigotes/100 células. Se calculó: a) el índice de reducción del N° de macrófagos infectados, y b) el índice de reducción de la carga parasitaria intracelular, empleando las siguientes fórmulas:

a) índice de reducción del número de macrófagos infectados:

$$100 - \left\{ \frac{\% \text{ macrófagos infectados en presencia de MIF}}{\% \text{ macrófagos infectados en ausencia de MIF}} \times 100 \right\}$$

b) índice de reducción de la carga parasitaria intracelular

$$100 - \left\{ \frac{\text{N° amastigotes/100 céls en presencia de MIF}}{\text{N° amastigotes/100 céls en ausencia de MIF}} \times 100 \right\}$$

1.6. Estudio de mecanismos parasitocidas inducidos por MIF

Se evaluó la capacidad de MIF para inducir la producción de distintos agentes parasitocidas (NO, ERO y TNF- α) por los macrófagos. En primer lugar, se realizó un ensayo *in vitro* para confirmar que MIF era capaz de activar dichos mecanismos en macrófagos libres de infección. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos a razón de 5×10^5 células/pocillo y cultivadas en medio RPMI completo, en presencia o ausencia de 1.000 ng/ml de MIFr, durante 6 ó 24 hs. Como control positivo se utilizaron cultivos estimulados con 1 μ g IFN- γ / 10^6 células.

Para determinar qué mecanismo/s parasitocida/s estaría/n involucrado/s en la eliminación del *T. cruzi*, se sembraron las células tal como se detalló en el párrafo anterior, se las infectó en una proporción 10 parásitos/célula y se las estimuló o no con 1.000 ng/ml de MIFr, durante 2 ó 72 hs. Para confirmar la especificidad del efecto de MIF, se realizó un control en el que los macrófagos infectados fueron tratados con MIF en presencia de un anticuerpo policlonal específico para esta CQ (concentración neutralizante 1.000 ng/ml²³⁹), cedido gentilmente por el Dr. R. Bucala (Universidad de Yale, New Haven, CT, EEUU).

Al cabo de los períodos indicados para ambos ensayos, se cosecharon los sobrenadantes (medios condicionados) y las células para la posterior medición por triplicado de los distintos mediadores con efecto parasitocida, como se detalla a continuación:

1.6.1. Cuantificación de NO

La producción de NO fue cuantificada indirectamente por acumulación de uno de sus productos de oxidación, el NO_2^- , mediante la reacción colorimétrica de Griess²⁴⁰. Se empleó medio RPMI sin rojo fenol ya que este indicador interfiere con dicha reacción. Brevemente, alícuotas de 50 μl de los medios condicionados fueron incubadas por triplicado con 100 μl de sulfanilamida al 1% (Sigma-Aldrich) y 100 μl de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina al 0,1% (Sigma-Aldrich) en 2,5% de H_3PO_4 . La reacción se desarrolló por 20 min a temperatura ambiente ($T^\circ \text{ amb}$) y se midió la absorbancia a 540 nm con un lector de placas (Multiskan, Thermo Labsystems, EEUU). La curva estándar se realizó con una solución de NaNO_2 , y comprendió 7 concentraciones, desde 60 hasta 0,8 μM .

1.6.2. Cuantificación de ERO

Los niveles intracelulares de ERO fueron cuantificados por el método del 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH; Sigma-Aldrich). La célula es permeable a este compuesto, que por la acción de los agentes oxidantes intracelulares se oxida a 2',7' diclorofluoresceína y emite fluorescencia. Las células J774 fueron pre-incubadas con DCFH a una concentración final de 5 nmoles/ml por 30 min, para permitir la internalización del fluoróforo. Finalizados los tratamientos correspondientes a cada experimento, las células fueron despegadas con tripsina (Gibco, Life Technologies, EEUU), centrifugadas por 5 min a 1.600 rpm y resuspendidas en paraformaldehído al 4% y sacarosa al 12% durante 15 min. Luego de lavar con PBS, la fluorescencia emitida por los macrófagos activados fue detectada con un citómetro de flujo Partec Past III (Alemania) a una longitud de onda de 488 nm. Los datos obtenidos se expresaron como % de células positivas para el marcador.

1.6.3. Cuantificación de TNF- α

El TNF- α presente en el sobrenadante de las células fue cuantificado por la técnica de ELISA (BD Pharmingen, EEUU) de acuerdo a las instrucciones especificadas en el

inserto. La proteína recombinante fue utilizada para generar la curva estándar. La sensibilidad del ensayo es de 15 pg/ml.

1.7. Producción de MIF por macrófagos infectados con *T. cruzi*

En ratones adultos de la cepa BALB/c, se indujo la exudación de células peritoneales mediante la inyección intraperitoneal de solución de tioglicolato al 3%. Al cabo de 72 hs se extrajeron las células dispersas en el fluido peritoneal, las cuales fueron sembradas en placas de 24 pocillos a razón de 2×10^6 células/ml de medio RPMI completo. Los macrófagos fueron seleccionados por adherencia a la placa durante 4 hs a 37°C, lavados con solución salina balanceada de Hanks (Invitrogen) e infectados por 48 hs con la cepa RA de *T. cruzi*²⁴¹ (gentilmente provista por el Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires) a distintas proporciones parásito/célula: 0:1, 1:1, 5:1 y 10:1. Luego de dicho período de infección, en los sobrenadantes celulares se cuantificaron los niveles de MIF por la prueba de ELISA (Kamiya Biomedical, EEUU), de acuerdo con las instrucciones del equipo. La proteína recombinante fue utilizada para generar la curva estándar. La sensibilidad del ensayo es de 0,16 ng/ml.

1.8. Estimulación de cardiomiocitos con MIF e infección con *T. cruzi*

Cardiomiocitos de la línea celular HL-1 fueron sembrados en placas de 6 pocillos a razón de 10^6 células/pocillo, infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* en una relación parásito/célula de 5:1 y estimulados por 72 hs previamente a la infección con MIFr. Por un lado se evaluó la actividad parasiticida de MIFr a distintas dosis, tal como se verificó en macrófagos. Por otra parte, se investigó el rol de la CQ (30 ng/ml) en la regulación de apoptosis en cardiomiocitos infectados. Las células adherentes que sufren apoptosis pierden su capacidad de adherirse a la placa y, en consecuencia, quedan en el sobrenadante. Por lo tanto, pasadas 24 hs de infección, se tripsinizaron las células que permanecían adheridas a la placa, a las que se sumaron las obtenidas por centrifugación del sobrenadante. En dicha población total de cardiomiocitos HL-1 se determinó la ocurrencia de apoptosis.

1.9. Detección de apoptosis celular en cardiomiocitos estimulados/infectados

Para la detección de células apoptóticas, se empleó la técnica de marcación con deoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL) utilizando el equipo comercial *ApopTag*®

Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon Int., EEUU) según instrucciones del fabricante. Esta técnica se basa en la asociación de los deoxinucleótidos (dNTPs) con los 3'OH terminales libres de los fragmentos de ADN originados durante el proceso de apoptosis²⁴². Estos dNTPs están conjugados a digoxigenina, asociada a su vez con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), que es detectable mediante citometría de flujo.

Brevemente, las células fueron centrifugadas a 1.600 rpm por 5 min y resuspendidas en 0,5 ml de PBS. A continuación fueron fijadas con 1,5 ml de paraformaldehído al 1% en PBS frío durante 15 min en hielo, lavadas nuevamente en PBS frío, centrifugadas y resuspendidas en etanol frío al 70% por 2 hs a -20°C. Luego de equilibrar las muestras con el buffer correspondiente, se incubaron las células 30 min a 37°C en cámara húmeda con la solución deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) en buffer de reacción, provista en el equipo. La enzima TdT cataliza la unión de los nucleótidos marcados disueltos en el buffer de reacción a los 3'OH terminales del ADN. Luego de lavar y centrifugar 2 veces con solución para frenar la reacción enzimática, se incubó cada muestra por 30 min a T° amb en oscuridad con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a FITC. Finalmente, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0,1% en PBS para permitir la incorporación de 0,5 µl de colorante vital ioduro de propidio 250X (Invitrogen), para contracolorar los núcleos celulares. Las muestras fueron adquiridas inmediatamente en un citómetro y se calculó el % de células apoptóticas (TUNEL +).

Todas las soluciones fueron preparadas con agua destilada y libre de desoxirribonucleasa (ADNasa), utilizando reactivos de grado biología molecular, para evitar resultados falsos positivos debido a una eventual contaminación con esta enzima.

Como control positivo de apoptosis se trataron cardiomiocitos con H₂O₂ al 15% durante 15 min. Luego de los lavados correspondientes, se procedió con el control como con el resto de las muestras. En el control negativo de la técnica se omitió el agregado de la enzima TdT.

2. Ensayos *in vivo* en el modelo murino de infección por *T. cruzi*

Todos los ratones utilizados en este trabajo fueron adquiridos en el bioterio central de la Comisión Nacional de Energía Atómica y mantenidos en el bioterio del Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez" bajo cuidadas condiciones de higiene y de acuerdo con el

Marco Ético de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de Laboratorio, CONICET. Los animales fueron agrupados y alojados en jaulas, en un número ≤ 5 ratones por cada grupo/jaula, provistos de comida y agua *ad libitum* y mantenidos en una atmósfera con 40-60% de humedad relativa y 21°C de T° amb.

2.1. Modelo animal de etapa aguda

2.1.1. Infección experimental con *T. cruzi*

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad. Los animales fueron infectados intraperitonealmente con una dosis individual de 50 tripomastigotes sanguíneos (volumen del inóculo: 500 μ l) de la cepa RA de *T. cruzi*. Para la realización de la curva de parasitemia se determinó el número de parásitos circulantes en cada ratón empleando 5 μ l de sangre obtenida de la vena caudal que se colocó entre portaobjeto y cubreobjeto (22 x 22 mm). El número de parásitos/ml se determinó por microscopía observando 50 campos a 400 X de aumento y multiplicando el número de parásitos contados por un factor de conversión que tiene en cuenta el número de campos microscópicos y el área. Se inició el monitoreo de la parasitemia al día 7 post-infección (dpi), continuando hasta su negativización, y se registró diariamente la mortalidad durante todo el período experimental.

2.1.2. Estudios histopatológicos de corazón y músculo esquelético

Los animales infectados y sus controles sin infectar (5/grupo correspondiente a un determinado dpi), fueron anestesiados con tiopental sódico (75 mg/kg) y sacrificados por dislocación cervical a los 7, 14, 21 y 28 dpi. De cada ratón se extrajo el corazón y una pieza de músculo esquelético, los cuales fueron fijados en formaldehído, embebidos en parafina, seccionados y teñidos con hematoxilina y eosina. El examen histopatológico fue llevado a cabo a través de un estudio a doble ciego, en el cual los cortes fueron codificados y evaluados al microscopio óptico en forma sistematizada, analizando en el tejido cardíaco las paredes auriculares y ventriculares separadamente. Se determinó la extensión y densidad de los infiltrados inflamatorios, su composición celular y la presencia de nidos parasitarios. Para la determinación de los focos inflamatorios, se adoptó el consenso de la Federación Cardiológica Mundial (Conferencia de Clasificación y Consenso de la F.C.M sobre la Histopatología e Inmunohistopatología de la Miocarditis, Marburg, Alemania; Abril 1997), la que considera un foco inflamatorio cuando existen ≥ 14 leucocitos/mm². El grado de inflamación en el tejido, se determinó como fue descrito

anteriormente²⁴³ en función de la siguiente escala numérica: 0, sin cambios significativos; 1, infiltrados inflamatorios focales; 2, infiltrados inflamatorios multifocales; 3, infiltrados inflamatorios confluentes que comprometen parcialmente la pared cardíaca; 4, infiltrados inflamatorios que comprometen la totalidad del espesor de la pared. La inflamación en el músculo esquelético fue graduada como 0, ausente; 1, focal; 2, multifocal; 3, multifocal confluyente ó 4, difusa, en 10 campos elegidos al azar a un aumento de 200x. La evaluación histopatológica fue llevada a cabo con la colaboración de la Dra. M. Postan (Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chaben", Buenos Aires). Una fracción del tejido cardíaco y una pieza de músculo esquelético (cuadríceps) se conservaron a -70°C para su posterior análisis por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR; ver ítem 2.1.3.1.).

2.1.3. Estudio de la expresión tisular de mediadores inflamatorios

2.1.3.1. A nivel del ARN mensajero

Mediante análisis por RT-PCR se determinó en cada uno de los órganos (corazón y músculo esquelético) extraídos de ratones infectados y controles no infectados, la expresión de ARN mensajero (ARNm) para CQ inflamatorias: IFN- γ , TNF- α y MIF; QQ inducibles por IFN- γ : CXCL9 y CCL5 y sus receptores específicos: CXCR3 y CCR5, respectivamente.

Luego de la disgregación del tejido mediante un homogeneizador, se extrajo el ARN total usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) según indicaciones del fabricante. Para ello, 100 mg de tejido fueron incubados con 1 ml del reactivo por 5 min a T° amb. Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de cloroformo, se agitó en vortex durante 30 seg y se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm por 20 min a 4°C. La fase acuosa resultante que contenía al ARN se precipitó con isopropanol frío durante un mínimo de 2 hs a -20°C, para luego ser centrifugada nuevamente durante 30 min en las mismas condiciones descritas. El precipitado (pellet) se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se secó en estufa a 37°C y se resuspendió en 20 μ l de agua libre de ribonucleasas. Una vez cuantificadas las muestras por espectrofotometría UV, se utilizaron 5 μ g de ARN para la transcripción reversa en un medio que incluía 3,2 μ l de una solución 2,5 mM de dNTPs (Invitrogen), 0,8 μ l de una solución 100 mM de ditioneitol (DTT), 1 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, Promega, EEUU), 8 μ l de buffer MMLV, 1,6 μ l de una solución 0,3 μ M de hexámeros de secuencia aleatoria (*random hexamers*, BioRad, EEUU) en un volumen final de 20 μ l. Iguales volúmenes de ADN complementario

(ADNc, 5 µl) fueron utilizados para la amplificación de los ARNm de los distintos mediadores y los controles internos, en un volumen final de reacción de 50 µl que contenía 4 µl de una solución 200 µM de dNTPs (BioRad), 0,5 µl de una solución 50 µM de cebadores (*primers*) específicos, 1,5 µl de una solución 25 mM de MgCl₂, 5 µl de buffer Taq [10x] y 0,25 µl de una solución 5 U/µl de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Para las QQ CXCL9 y CCL5 se procedió de la misma forma que lo detallado, con excepción de la concentración de *primers* específicos, que en este caso fue de 55 µM (1 µl). Como control interno, se amplificaron dos genes constitutivos: β-actina y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). La reacción de PCR para las correspondientes QQ, RQQ, CQ y controles internos fue idéntica para ambos tejidos.

En la Tabla II se detallan las secuencias nucleotídicas y las condiciones de ciclado utilizadas para cada par de *primers* empleados en la amplificación de los transcritos.

El producto final de la reacción de PCR fue analizado mediante corrida electroforética en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz UV. Se realizó el análisis densitométrico de los productos amplificados utilizando el programa ScionImage (NIH, EEUU), lo cual permitió una semicuantificación de las bandas electroforéticas. El resultado se expresa como la relación entre la señal obtenida para cada transcripto analizado (corregido según el valor correspondiente a β-actina de la misma muestra) y la señal corregida obtenida para dicho transcripto en los animales control, en el caso de que presente expresión constitutiva detectable.

Tabla II: Detalle de la secuencia y el ciclado según el par de primers específicos utilizados.

Murinos:

β-actina		
Sentido: 5' CGG AAC CGC TCA TTG CC 3'		
Antisentido: 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3'		
Desnaturalización Inicial		94°C, 5 min
25 ciclos	Desnaturalización	94°C, 1 min
	Hibridación	52°C, 1 min
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 10 min

GAPDH		
Sentido: 5´ GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC 3´ Antisentido: 5´ CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG 3´		
Desnaturalización Inicial		94°C, 5 min
28 ciclos	Desnaturalización	94°C, 30 seg
	Hibridación	55°C, 30 seg
	Extensión	72°C, 45 seg
Extensión Final		72°C, 10 min

IFN-γ		
Sentido: 5´ AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG 3´ Antisentido: 5´ GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG 3´		
Desnaturalización Inicial		94°C, 5 min
35 ciclos	Desnaturalización	94°C, 1 min
	Hibridación	55°C, 1 min
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 10 min

TNF-α		
Sentido: 5´ ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC 3´ Antisentido: 5´ TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CTG C 3´		
Desnaturalización Inicial		94°C, 5 min
35 ciclos	Desnaturalización	94°C, 1 min
	Hibridación	60°C, 1 min
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 10 min

MIF		
Sentido: 5´ CCA TGC CTA TGT TCA TCG TG 3´ Antisentido: 5´ GAA CAG CGG TGC AGG TAA GTG 3´		
Desnaturalización Inicial		95°C, 5 min
30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
	Hibridación	55°C, 1 min
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 10 min

CCL5		
Sentido: 5´ CGC GGA TCC CCA CGT CAA GGA GTA TTT CTA CAC C 3´ Antisentido: 5´ CGC GGA TCC CTG GTT TCT TGG GTT TGC TGT G 3´		
Desnaturalización Inicial		94°C, 2 min
35 ciclos	Desnaturalización	94°C, 15 seg
	Hibridación	60°C, 30 seg
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 7 min

CXCL9		
Sentido: 5´ GAT CAA ACC TGC CTA GAT CC 3´ Antisentido: 5´ GGC TGT GTA GAA CAC AGA GT 3´		
Desnaturalización Inicial		94°C, 2 min
35 ciclos	Desnaturalización	94°C, 1 min
	Hibridación	54°C, 1 min
	Extensión	72°C, 2 min
Extensión Final		72°C, 7 min

CCR5		
Sentido: 5´ CAA GAC AAT CCT GAT CGT GCA A 3´ Antisentido: 5´ TCC TAC TCC CAA GCT GCA TAG AA 3´		
Desnaturalización Inicial		95°C, 15 min
45 ciclos	Desnaturalización	94°C, 15 seg
	Hibridación	56°C, 20 seg
	Extensión	72°C, 15 seg
Extensión Final		72°C, 10 min

CXCR3		
Sentido: 5´ GCC TTT CTT CTG GAA AAC AGC 3´ Antisentido: 5´ TGC TGC TCA GGG CAG TGC GC 3´		
Desnaturalización Inicial		94°C, 2 min
35 ciclos	Desnaturalización	94°C, 30 seg
	Hibridación	48°C, 30 seg
	Extensión	72°C, 1.5 min
Extensión Final		72°C, 4 min

Humanos:

β-actina		
Sentido: 5' CGG AAC CGC TCA TTG CC 3' Antisentido: 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3'		
Desnaturalización Inicial		94°C, 5 min
25 ciclos	Desnaturalización	94°C, 1 min
	Hibridación	52°C, 1 min
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 10 min

GAPDH		
Sentido: 5' ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG 3' Antisentido: 5' CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC 3'		
Desnaturalización Inicial		94°C, 1 min
25 ciclos	Desnaturalización	94°C, 1 min
	Hibridación	60°C, 2 min
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 4 min

IFN-γ		
Sentido: 5' ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT 3' Antisentido: 5' GGA ATT CAC TGG GAT GCT CTT CGA CCT CGA 3'		
Desnaturalización Inicial		94°C, 1 min
35 ciclos	Desnaturalización	94°C, 1 min
	Hibridación	60°C, 2 min
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 4 min

MIF		
Sentido: 5' CTC TCC GAG CTC ACC CAG CAG 3' Antisentido: 5' CGC GTT CAT GTC GTA ATA GTT 3'		
Desnaturalización Inicial		95°C, 5 min
30 ciclos	Desnaturalización	94°C, 1 min
	Hibridación	60°C, 1 min
	Extensión	72°C, 1 min
Extensión Final		72°C, 10 min

2.1.3.2. A nivel de proteína

En las muestras de corazón y músculo esquelético fijadas en formol e incluidas en parafina, se procedió a la detección de MIF, CCL5 y su receptor, CCR5, por inmunohistoquímica (IHQ). Brevemente, las muestras fueron desparafinadas con xilol y luego se hidrataron por pasajes sucesivos en etanol 100° y 90°, para concluir con agua destilada y PBS. Se realizó el desenmascaramiento antigénico incubando durante 10 min los preparados con solución de recuperación antigénica 1X (Dako, Dinamarca) en microondas (800 W) y repitiendo este procedimiento una vez más. Luego del enfriamiento, se lavó con agua destilada. La detección de MIF no requirió de este proceso. A continuación se bloquearon la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% por 5 min y los sitios inespecíficos con una solución de bloqueo proteica libre de suero (Dako) por 10 min. Para anular la posible presencia de biotina endógena, se utilizó *biotin blocking system* (Dako) durante 20 min. A continuación, se utilizaron en cada caso los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal anti-MIF de ratón, hecho en conejo (dil. 1/1.000; Zymed, Life Technologies, EEUU), anticuerpo monoclonal anti-CCL5 de ratón, hecho en rata, conjugado con biotina (dil. 1/10; R&D Systems) y anticuerpo policlonal anti-CCR5 de ratón, hecho en conejo (dil. 1/100; Abcam, Reino Unido). Todas las inmunoglobulinas fueron diluidas en una solución comercial para reducción de fondo inespecífico (Dako) e incubadas por 1 h a T° amb. Como anticuerpo secundario para la detección de MIF y CCR5 se empleó una inmunoglobulina monoclonal anti-Ig de conejo hecha en cabra, marcada con biotina (Vector, EEUU), en una dil. 1/50 en seroalbúmina bovina (BSA) al 2% en PBS por 1 h a T° amb. Finalmente, las muestras fueron incubadas con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Dako) durante 30 min y reveladas con diaminobencidina (DAB, Dako). El punto final de la reacción se determinó por observación al microscopio óptico en campo de 40 X hasta detenerla con agua destilada. Se realizó una tinción con ácido peryódico-Schiff (PAS), para visualizar las membranas celulares. Como controles positivos se utilizaron muestras de cerebro (para MIF), carcinoma rectal (para CCR5) y ganglio reactivo (para CCL5) de rata.

La expresión del receptor CXCR3 se evaluó por inmunofluorescencia directa. Las muestras fueron desparafinadas como se detalló previamente, se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA al 2% en PBS por 1 h y luego incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-CXCR3 de ratón, hecho en rata, marcado con aloficocianina (APC, dil. 1/100; R&D Systems) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, luego de lavar varias veces con PBS en oscuridad, los preparados se contracoloraron y se montaron con DAPI/*antifade solution* (Chemicon). Las muestras fueron observadas al microscopio de

fluorescencia Zeiss AxioStar 1, con un aumento de 10X y 40X y las imágenes fueron registradas con una cámara de fotos AxioCam (Carl Zeiss, Alemania).

2.2. Modelo animal de etapa crónica

2.2.1. Modelos de infección crónica indeterminada y severa

Se utilizaron ratones hembras de la cepa C3H/HeN de 8 semanas de edad, obtenidas y mantenidas como se detalló en el ítem 2.

Como modelo de la etapa crónica indeterminada de la infección, los animales fueron infectados por vía intraperitoneal con 50 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*²⁴⁴. En este modelo, la lesión en el miocardio es de aparición variable, restringida a pocas áreas y presenta leve inflamación focal, sin registro de alteraciones electrocardiográficas.

Para el modelo de la etapa crónica con miocardiopatía severa, se inyectaron 10⁶ tripomastigotes sanguíneos de la cepa Sylvio, clon X10/4, como se describió previamente²⁴⁵. Este modelo se caracteriza por una infección progresiva hacia la cardiopatía inflamatoria a largo plazo con severo daño tisular, con intensos infiltrados de células mononucleares que comprometen todo el órgano, fibrosis, calcificaciones y vasculopatía.

Los animales fueron sacrificados a los 120 dpi con los cuidados ya mencionados.

2.2.2. Aislamiento y caracterización fenotípica del infiltrado inflamatorio de miocardio y de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ratones infectados

En el modelo experimental de miocardiopatía chagásica crónica severa, de cada ratón sacrificado se aisló el corazón y se obtuvo por punción retro-orbital un volumen de alrededor de 1 ml de sangre. Los corazones extraídos asépticamente fueron colocados en tubo Falcon con 5 ml de medio RPMI suplementado con SFB al 1%. Se cortaron en trozos pequeños, para su posterior digestión enzimática a 37°C durante 45 min con 200 FALGPA U/ml de colagenasa tipo IV de *Clostridium histolyticum* más 200 FALGPA U/ml de hialuronidasa tipo IV-S (Sigma-Aldrich). Luego, se retiró el sobrenadante de la digestión

y se repitió el procedimiento una vez más, para mejorar el rendimiento de la extracción de las células leucocitarias del infiltrado cardíaco.

Para aislar las células mononucleares, se sembró el sobrenadante obtenido de la digestión tisular (o la sangre sin diluir) sobre un colchón de Histopaque® 1083 (Sigma-Aldrich), en una relación de 1:1. Se centrifugó por 30 min a 1.600 rpm a T° amb y se separó la interfase que alojaba a la fracción celular de interés. Se lavó con PBS y se volvió a centrifugar por 10 min, quedando las células resuspendidas finalmente en PBS con SFB al 10%. Se procedió al recuento de ambas poblaciones celulares (tisular y sanguínea) por tinción con el colorante vital azul tripán y de cada una de ellas se colocaron 5×10^5 células/tubo. Para evitar la marcación inespecífica, las células fueron pre-incubadas con 10 μ l de sobrenadante del hibridoma 2.4G2, productor de anticuerpos monoclonales anti-receptores Fc gamma de macrófagos, generosamente cedido por el Dr. G. Mirkin (Facultad de Medicina, UBA). Para caracterizar las subpoblaciones leucocitarias indicadas, se añadieron los siguientes anticuerpos monoclonales marcados, en un volumen final de 100 μ l:

- Macrófagos: anti MAC-1/CD11b-PerCP-Cy 5.5 (dil. 1/400) y MAC-1/CD11b-PE (dil. 1/200); anti CXCR3-APC (10 μ l / 10^5 céls).
- Linfocitos T: anti CD3-FITC (dil.1/100); anti CD4-PE (dil.1/200); anti CD8-Alexa Fluor 647 (dil.1/200) y CD8-FITC (dil.1/200); anti CXCR3-APC.

Todos los anticuerpos utilizados fueron de BD Pharmingen, a excepción del anti-CXCR3, de R&D Systems. Para la marcación múltiple se tuvo en cuenta el espectro de emisión de cada fluoróforo y se evitó la superposición de los mismos. Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos durante 30 min en oscuridad, para luego ser fijadas con una solución fresca de formaldehído al 4%, durante 20 min. Finalmente, las células fueron adquiridas en un citómetro y analizadas con el programa Cyflogic 1.2.1. En todos los casos, fueron contadas al menos 5×10^4 células y la población de leucocitos mononucleares fue seleccionada de acuerdo a las características de viabilidad, los valores citométricos de *forward scatter* (FSC) y *side scatter* (SSC), y la expresión de CD3.

2.2.3. Tratamiento con benznidazol durante la etapa crónica de la enfermedad de Chagas experimental

Se infectaron 15 ratones con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* según las condiciones detalladas en el punto 2.2.1. A los 90 días, se dividieron en 3 grupos de 5 animales cada

uno: G1- ratones infectados, G2- ratones infectados y tratados con una suspensión de BZ (Radanil®, Roche) en carboximetilcelulosa al 1% y G3- ratones no infectados, tratados con BZ. El BZ se administró diariamente por vía intragástrica a razón de 100 mg/kg peso por un período de 30 días. A los 60 días de finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de tejido cardíaco y de músculo esquelético para análisis de ARN e inmunohistoquímico.

2.2.4. Estudio de la expresión tisular de mediadores inflamatorios

La expresión de los ARNm de los mediadores inflamatorios MIF, IFN- γ , TNF- α , CCL5, CXCL9, CCR5 y CXCR3 fue estudiada como se ha descrito en el ítem 2.1.3.1. A nivel de la proteína de MIF, según lo mencionado en el ítem 2.1.3.2.

3. Ensayos en la infección humana por *T. cruzi*

3.1. Aspectos éticos

Los protocolos de investigación fueron aprobados por los Comités de Docencia e Investigación y de Bioética del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez” (HNRG) y los Hospitales Generales de Agudos “Dr. Cosme Argerich” (CA) y “José María Ramos Mejía” (RM), de la Ciudad de Buenos Aires. A los pacientes adultos se les requirió la firma del consentimiento informado. También se solicitó el consentimiento firmado por el padre o adulto responsable en el caso de los niños menores y el asentimiento a los niños mayores de 7 años (ver Anexo). Los estudios fueron conducidos respetando el Código de Nüremberg, la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (actualización 1989 y X-2000) y la Convención sobre los Derechos del Niño, incluidos en la Constitución de la Nación Argentina (1994).

3.2. Selección y caracterización de la población

La población pediátrica incluyó 30 niños infectados con *T. cruzi* ingresados en el Servicio de Parasitología y Chagas del HNRG, para su diagnóstico y tratamiento. Los criterios de exclusión fueron: padecer concomitantemente otra enfermedad infecciosa, además de ECh; enfermedades autoinmunes; procesos inflamatorios agudos o crónicos, ó que hayan recibido previamente tratamiento etiológico. El rango de edad de la población estudiada fue amplio, subdividiéndose en dos grupos: a) menores de 2 meses (fase aguda de la enfermedad) y b) entre 8 y 17 años (fase crónica indeterminada

temprana). La relación de sexos fue 1. Como grupo control, se enrolaron 19 niños del mismo rango de edad y relación de sexos que no estaban infectados con *T. cruzi* (serología específica no reactiva). El 100% de los pacientes pediátricos residía en la Ciudad de Buenos Aires y sus alrededores, con condiciones socioeconómicas similares. Esta región es libre del vector y no se considera área endémica, por lo tanto la posibilidad de reinfección es prácticamente nula. Todos los niños que ingresan al Servicio con diagnóstico confirmado de ECh son tratados; sin embargo, en esta parte del trabajo sólo se estudió el efecto del tratamiento con BZ sobre la población cursando la etapa crónica indeterminada temprana. Los pacientes infectados fueron tratados por vía oral con BZ (Radanil[®], Roche, Argentina) en dos dosis de 5-8 mg/kg/día, por 60 días. Desde el diagnóstico (T0), los pacientes fueron seguidos clínicamente [electrocardiograma (ECG) y ecocardiograma (ECO)] y por exámenes de laboratorio (serología para *T. cruzi*, hemograma, hepatograma, nivel de creatinina en sangre), a los 30 días, a los 60 días (fin del tratamiento, T1) y 6 meses luego de completada la terapia parasitocida (T2). Además, se monitoreó la respuesta parasitológica al tratamiento mediante PCR para detección de ADN de *T. cruzi* en sangre²⁸.

Los pacientes adultos con ECh crónica fueron reclutados en el Servicio de Cardiología de los hospitales CA y RM. Fueron evaluados clínicamente y agrupados de acuerdo a la clasificación de Kuschnir²⁴⁶ en: Grupo 0 (G0), que incluyó individuos seropositivos cuyos exámenes (ECG, ECO y radiografía de tórax) arrojaron resultados dentro de los parámetros normales, y Grupo 3 (G3), formado por pacientes con serología reactiva para Chagas que presentaron anormalidades en ECG y ECO, alteraciones en la conducción eléctrica, cardiomegalia, y evidencia clínica y radiológica de falla cardíaca. La clasificación en G0 y G3 corresponde a las formas indeterminada y severa de la ECh, respectivamente. El grupo control (C) consistió en individuos sanos dentro del mismo rango de edad y relación de sexos, serológicamente negativos para *T. cruzi* y sin ninguna evidencia de miocardiopatía. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que presentaban alguna de las siguientes patologías: hipertensión, enfermedad cardíaca congénita, hipercolesterolemia, enfermedad isquémica o vascular, cáncer, evidencia clínica de cualquier enfermedad infecciosa, artritis, diabetes, alergia o desórdenes inflamatorios/autoinmunes. Se analizaron diversos parámetros ecocardiográficos de relevancia para la caracterización clínica de la miocardiopatía por ECh, incluyendo a: los diámetros diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI), sistólico del ventrículo izquierdo (DSVI), de la aurícula izquierda (DAI) y de la aorta (DA), así como también la fracción de acortamiento (FA). El estudio de esta población fue realizado a doble ciego, donde -

previo al estudio de los mediadores inflamatorios- sólo los médicos cardiólogos intervinientes tuvieron conocimiento del grupo al que pertenecía cada paciente.

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en ambas poblaciones, pediátrica y adulta, fue confirmado en el Servicio de Parasitología y Chagas del HNRG, por las siguientes técnicas: hemaglutinación indirecta (IHA, Polychaco, Argentina), ELISA (Wiener, Argentina) y test de aglutinación pasiva de partículas (PPA, Bayer, Argentina). Se consideraron positivos aquellos títulos de anticuerpos específicos ≥ 16 por IHA y PPA, así como los valores de ELISA superiores a 1,2. Todo paciente con ≥ 2 de los 3 ensayos positivos fue diagnosticado como infectado con *T. cruzi*.

3.3. Determinación de mediadores inflamatorios

3.3.1. En células sanguíneas

De cada uno de los pacientes pediátricos se extrajo sangre por punción venosa (5 ml) en un tubo estéril que contenía 50 μ l de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 16% p/v) y se le agregó igual volumen de PBS. La muestra de sangre diluida fue depositada lentamente en un gradiente de Ficoll-Hypaque® Plus (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) y centrifugada a 1.600 rpm por 30 min. Al finalizar, se separó cuidadosamente el halo donde se ubicaban las CMSP, que fueron lavadas 2 veces con PBS. La extracción de ARN total de las CMSP, la retrotranscripción a ADNc y el posterior análisis de la expresión de CQ por PCR, se realizó como se describe en el ítem 2.1.3.1. La secuencia de los *primers* humanos utilizados se detalla en la Tabla II.

3.3.2. En suero

En las muestras de suero de cada paciente pediátrico y adulto se determinó el nivel de MIF (R&D Systems) e IFN- γ (BD Pharmingen) por la técnica de ELISA, según especificaciones del fabricante. En las muestras de los pacientes adultos, se cuantificaron además los niveles circulantes de TNF- α por ELISA (Chemicon) y de proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR-AS) por inmunonefelometría optimizada por látex (Siemens, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las CQ recombinantes provistas con los equipos fueron utilizadas para generar las correspondientes curvas estándar. La sensibilidad de cada ensayo es: MIF, 125,0 pg/ml; IFN- γ , 31,3 pg/ml; TNF- α , 4,8 pg/ml; PCR-AS, 0,4 mg/L.

4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prisma versión 5.0 (GraphPad Software, EEUU), excepto para el análisis de regresión múltiple que se llevó a cabo mediante el programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., EEUU). De acuerdo con el caso, se calcularon los valores correspondientes a la media aritmética grupal, al error estándar de la media (ESM), y a la mediana (con rango intercuartiles) de la población. Para las comparaciones entre los distintos grupos se emplearon las siguientes pruebas paramétricas y no paramétricas:

- ✓ entre 2 grupos: t de Student; Mann-Whitney; Fisher. Para analizar la covariación entre variables se usó la correlación de Pearson.
- ✓ entre 3 ó más grupos: análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de comparación múltiple por Tukey ó Bonferroni; análisis de tendencia lineal; Friedman; Kruskal-Wallis con post-test de Dunn.
- ✓ para establecer las diferencias, los valores de *P* inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Papel de MIF en la respuesta inflamatoria que se desarrolla en la etapa temprana de la infección con *T. cruzi*

1.1. Efecto de MIF en la reducción del número de macrófagos infectados y la eliminación de parásitos intracelulares

Se estudió el efecto de MIF sobre la invasión de *T. cruzi* a los macrófagos en cultivo. Luego de 2 hs de pre-tratamiento celular con MIF y otras 2 hs de contacto con *T. cruzi* (lapso adecuado para cuantificar la población de parásitos que ingresaron a los fagocitos sin que la valoración se vea afectada significativamente por la tasa de multiplicación de amastigotes), la proporción de células sin infectar no se modificó, independientemente del uso de concentraciones crecientes (100-1.000 ng/ml) de la CQ recombinante. Sin embargo, al cabo de un plazo prolongado de estimulación (72 hs pre-infección), MIF fue capaz de aumentar, en forma dependiente de la dosis (línea de tendencia creciente, $P<0,05$), el número de células no parasitadas ($18,5 \pm 16,3$ %, $44,2 \pm 8,7$ % y $47,3 \pm 7,2$ % para 100-500-1.000 ng/ml de MIF, respectivamente)(Fig. 1A). También en función de la concentración de CQ empleada, se comprobó una reducción significativa ($P<0,05$) en la cantidad de parásitos intracelulares, tanto en las células pre-estimuladas por 2 hs ($7,1 \pm 6,1$ %, $51,9 \pm 12,1$ % y $60,5 \pm 5,8$ % para 100-500-1.000 ng/ml de MIF, respectivamente) como por 72 hs ($36,2 \pm 3,0$ %, $77,3 \pm 9,0$ % y $81,4 \pm 8,0$ % para 100-500-1.000 ng/ml de MIF, respectivamente) (Fig. 1B y microfotografía 1).

Para confirmar si este efecto parasitostático/parasitocida de MIF en macrófagos infectados también ocurría en células no fagocíticas, se estimularon cardiomiocitos murinos HL-1 con la CQ recombinante y se infectaron con *T. cruzi* (en idénticas condiciones que las descritas para fagocitos), para luego proceder al recuento de parásitos intracelulares. Los resultados demostraron que MIF no fue capaz de reducir la tasa de miocitos infectados ni la carga parasitaria en este tipo celular (Fig. 1C).

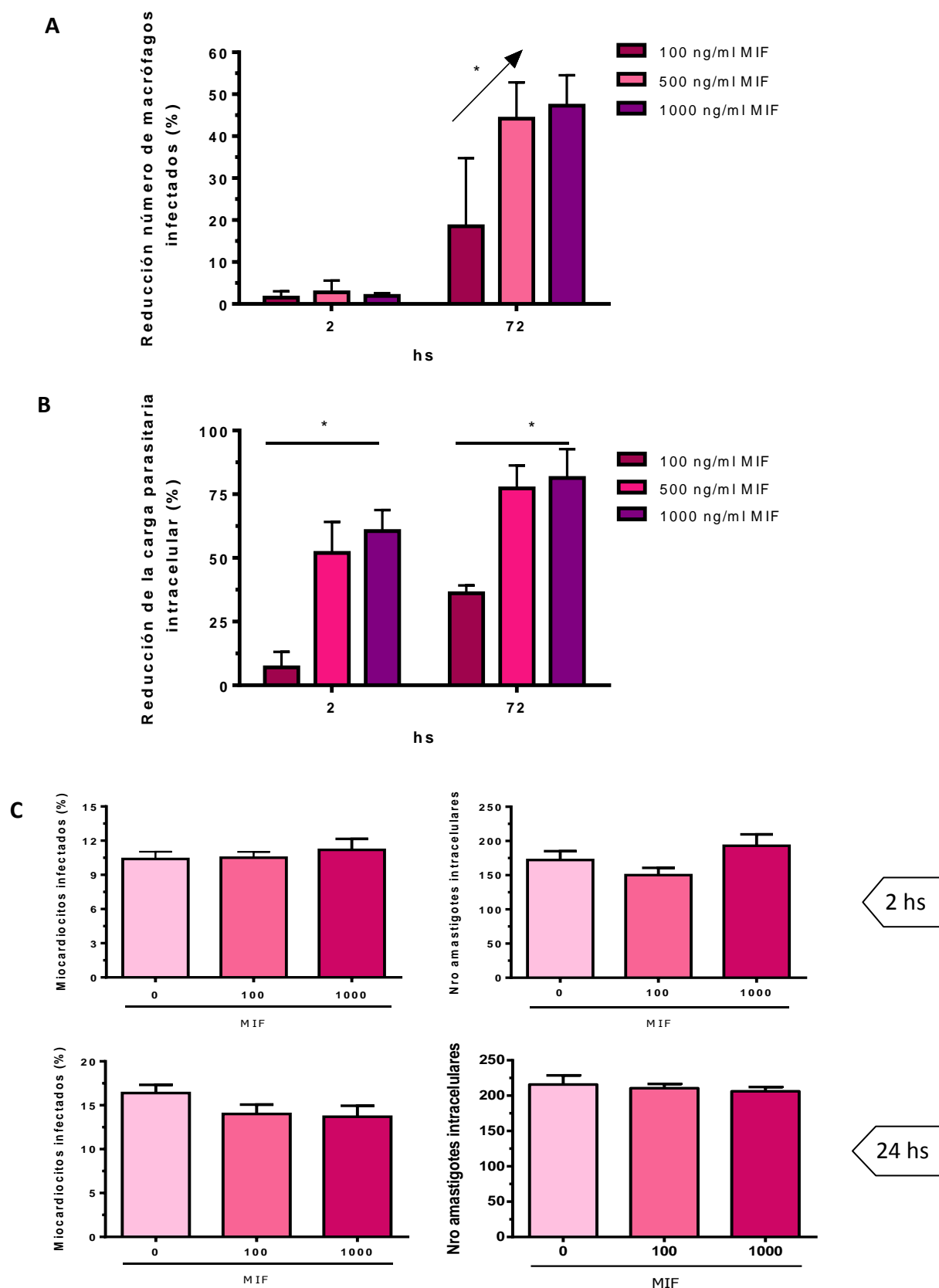
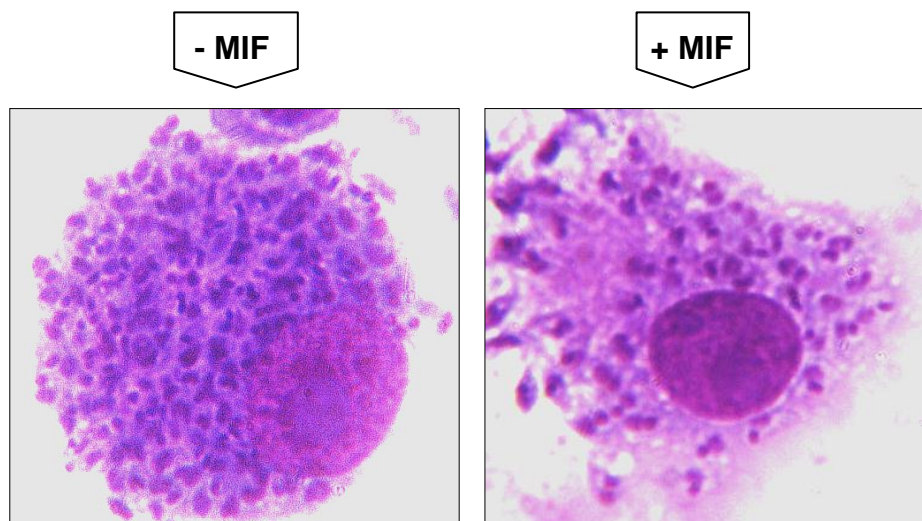


Fig. 1: Efecto de la estimulación con MIF sobre células infectadas con *T. cruzi*.

Reducción en el número de macrófagos infectados (**A**) y de amastigotes intracelulares (**B**) luego de 2 y 72 hs de estimulación con 100, 500 y 1000 ng/ml de MIF. En el panel (**C**) se muestran los

resultados obtenidos en cardiomiocitos murinos HL-1 infectados con *T. cruzi* por 2 ó 24 hs y tratados o no con MIF. Todos los datos son presentados como el valor medio \pm ESM. $*P<0,05$: 100 vs 1.000 ng/ml de MIF y línea de tendencia ascendente.



Microfotografía 1: Reducción en el número de amastigotes intracelulares en macrófagos tratados con MIF. Las células fueron incubadas con 1.000 ng/ml de MIF durante 72 hs o sin estímulo alguno. Al cabo de este tiempo, los macrófagos fueron fijados con formol al 5% y teñidos con hematoxilina-eosina. Aumento 100X.

1.2. Efecto sinérgico de MIF e IFN- γ en la activación de macrófagos

La co-estimulación de macrófagos con IFN- γ (1 μ g) y MIF demostró ser más efectiva para el control de la infección en los fagocitos que el tratamiento con IFN- γ exclusivamente. La reducción en la cantidad de macrófagos infectados y en la carga parasitaria intracelular fueron dependientes de la concentración de MIF utilizada en combinación con el IFN- γ (Fig 2, A y B). A una baja concentración de MIF (100 ng/ml), la inducción de la actividad parasitocida de los macrófagos por MIF+IFN- γ no resultó sustancialmente diferente de la observada con el estímulo de IFN- γ aislado. Sin embargo, al emplear 500 ng/ml de MIF conjuntamente con el IFN- γ , sí se encontraron diferencias significativas ($P<0,05$) en la actividad anti-amastigote, aunque no se logró disminuir significativamente la tasa de células infectadas. Finalmente, a la máxima concentración de MIF ensayada (1.000 ng/ml), se verificó una diferencia significativa ($P<0,05$) entre las células tratadas con IFN- γ solo y aquellas estimuladas conjuntamente con MIF e IFN- γ ($18,9 \pm 4,8$ % vs $83,1 \pm 8,3$ % de reducción de células infectadas; y $39,9 \pm 7,2$ % vs $86,0 \pm 5,5$ % de reducción de parásitos intracelulares, respectivamente).

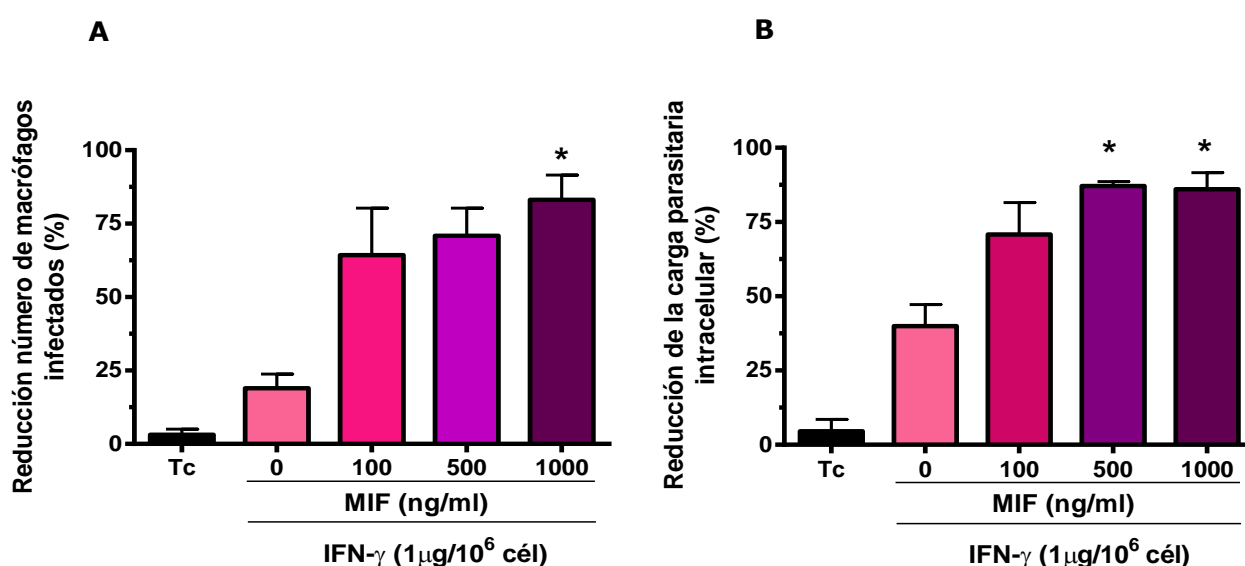


Fig. 2: Efecto del co-tratamiento de MIF con IFN- γ sobre la cantidad de células parasitadas y de amastigotes intracelulares. Macrófagos murinos infectados con *T. cruzi* fueron tratados o no con dosis crecientes de MIF (100, 500 y 1.000 ng/ml) y estimulados con IFN- γ (1 μ g/10⁶ céls). Luego de 24 hs las células fueron fijadas y teñidas con Giemsa para la visualización de los parásitos intracelulares. Se determinó la cantidad de células parasitadas **(A)** y de amastigotes intracelulares **(B)**. Los datos son presentados como el valor medio \pm ESM. * $P < 0,05$: Tc y 0 vs 500 ó 1.000 ng/ml MIF.

1.3. Efecto inductor de MIF sobre los macrófagos

Se estudió la capacidad de MIF para estimular en fagocitos la generación de moléculas como TNF- α , NO y ERO que pueden afectar la sobrevivencia del parásito. Luego de 6 hs de incubación en presencia de MIF (1.000 ng/ml) la producción de estos agentes era prácticamente indistinguible de la observada en el control sin tratar (salvo un ligero incremento de ERO), pero al cabo de 24 hs los macrófagos respondieron a la estimulación con MIF liberando niveles aumentados de los mediadores inflamatorios (Fig. 3). En comparación con la activación por IFN- γ , MIF resultó ser un mejor inductor de TNF- α (1.907,00 \pm 97,00 vs 564,50 \pm 35,50 pg/ml) y ERO (44,35 % vs 19,20 % de células positivas), ($P < 0,05$, Fig. 3A y C), y un estímulo de menor eficiencia para la liberación de NO (4,6 \pm 0,70 vs 12,53 \pm 0,40 μ M) (Fig. 3B).

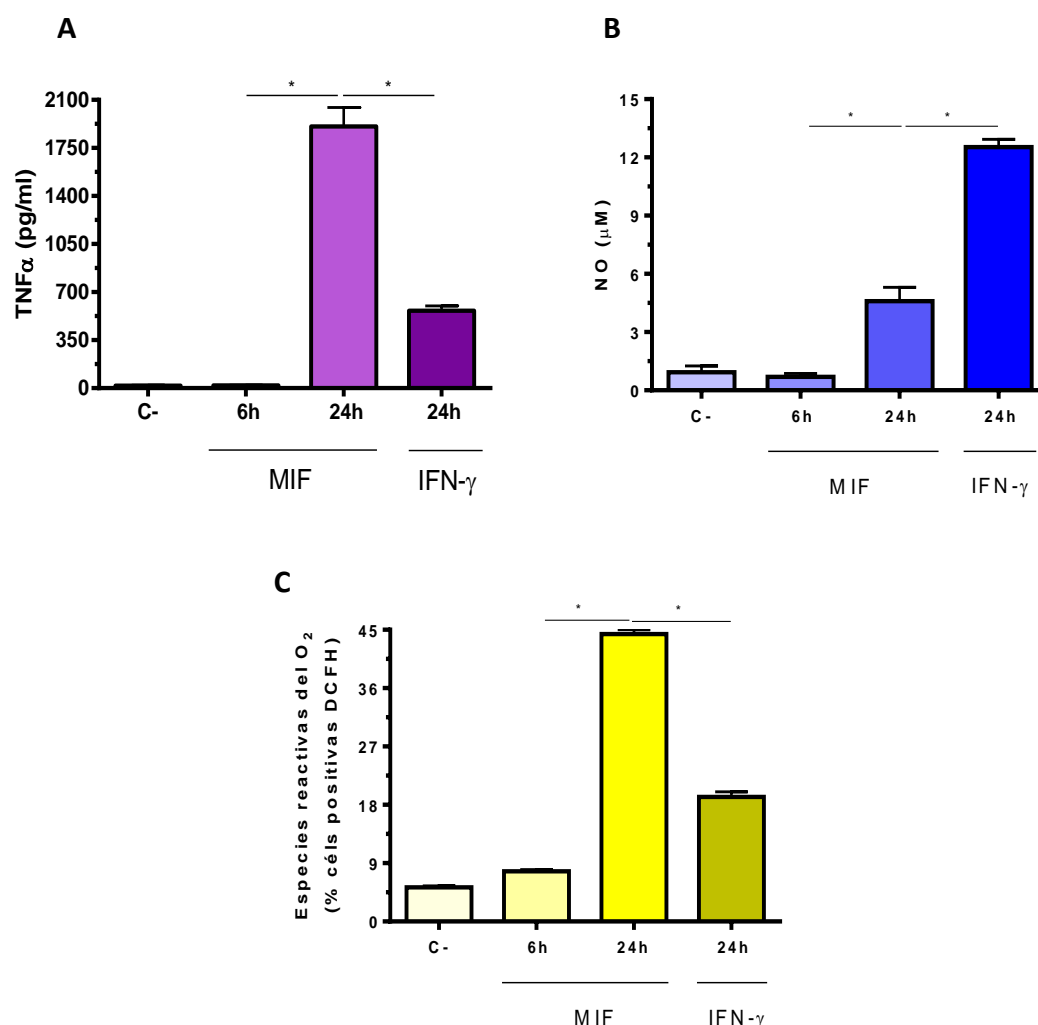


Fig. 3: Efecto de MIF sobre la expresión de TNF- α , NO y ERO en macrófagos murinos. Las células fueron estimuladas o no con 1000 ng/ml de MIF o 1 μ g/ 10^6 céls de IFN- γ , a los tiempos indicados. Los sobrenadantes fueron recolectados para la medición de TNF- α **(A)** por la técnica de ELISA y NO **(B)** por el método de Griess; las células fueron tripsinadas y teñidas con DCFH para estudiar la expresión de ERO **(C)**. Las mismas fueron adquiridas en un citómetro de flujo para determinación del % de células positivas para DCFH. Los datos son presentados como el valor medio \pm ESM. * $P < 0,05$.

1.4. Mecanismos parasitocidas inducidos por MIF en fagocitos

Habiendo verificado que MIF contribuye a controlar la infección de macrófagos por *T. cruzi* (ver ítems 1.1. y 1.2.), se investigaron posibles mecanismos parasitocidas que son disparados por esta CQ en este tipo de células (ver ítem 1.3.). MIF fue capaz de inducir significativamente ($P < 0,05$) ERO en forma muy temprana (2 hs) en los macrófagos infectados (Fig. 4B). Sin embargo, no logró el mismo efecto precoz con otros

mediadores, como NO y TNF- α , que permanecieron en niveles basales o indetectables (Fig. 4, A y C). Al tiempo mencionado, el parásito *per se* tampoco consiguió potenciar la generación de estas moléculas. A más largo plazo (72 hs), en cambio, la infección con *T. cruzi* indujo la producción de NO, ERO y TNF- α en forma sustancial, situación que se vio incrementada en forma significativa ($P<0,05$) al estimular con MIF las células infectadas ($15,7 \pm 0,5$ vs $21,5 \pm 1,5$ μ M NO; $44,3 \pm 0,8$ vs $70,3 \pm 6,3$ % de células positivas; $34,3 \pm 3,1$ vs $610,0 \pm 10,0$ pg/ml de TNF- α , para muestras sin y con tratamiento con MIF, respectivamente) (Fig. 4, A-C).

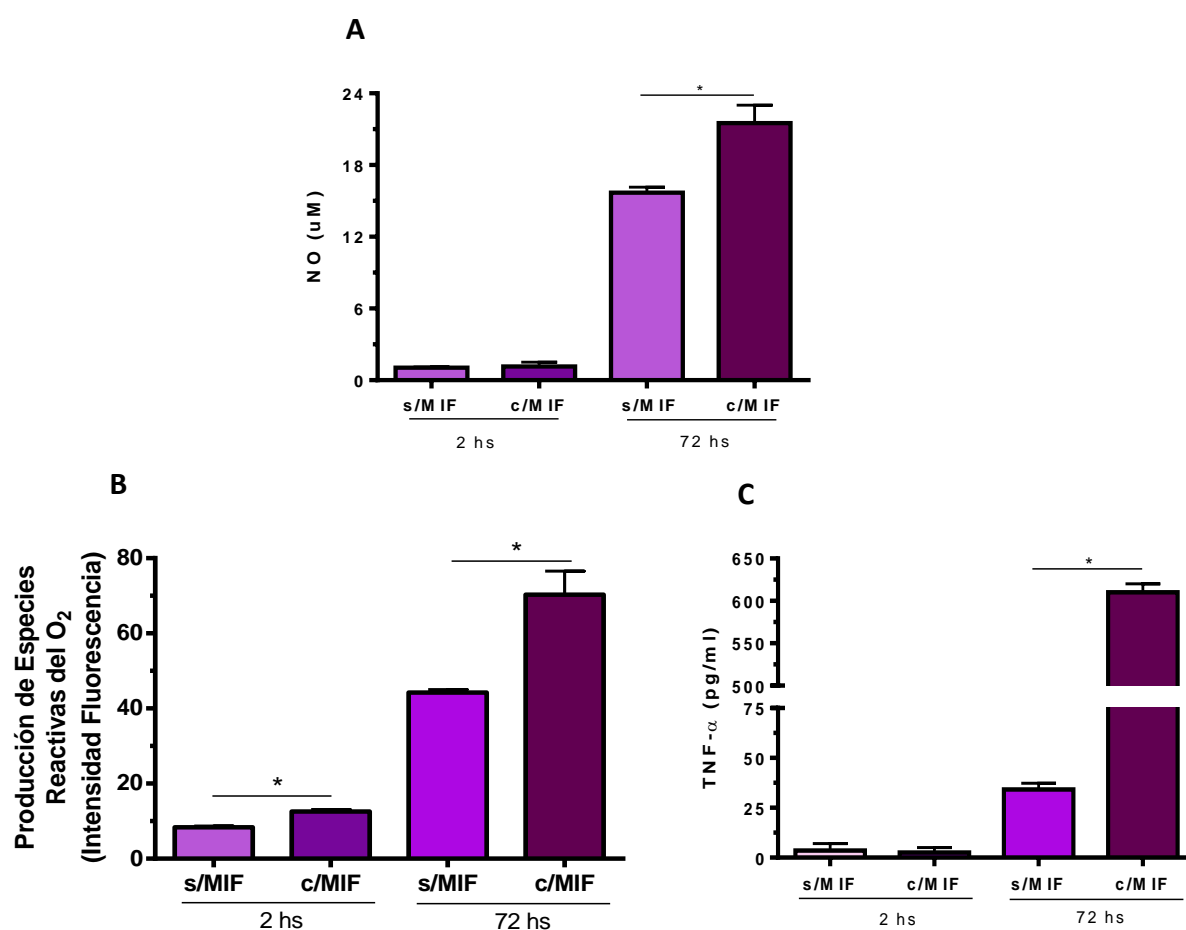


Fig. 4: Mecanismos parasiticidas inducidos por MIF en células fagocíticas.

Expresión de NO (A), ERO (B) y TNF- α (C), en macrófagos murinos infectados con *T. cruzi* y estimulados o no con 1000 ng/ml por 2 ó 72 hs. Los datos son presentados como el valor medio \pm ESM. * $P<0,05$.

Para certificar que la activación de mecanismos parasiticidas observada en macrófagos fue por efecto directo de MIF, las células fueron incubadas en presencia de un anticuerpo específico para MIF (Fig. 5). El tratamiento con dicho anticuerpo redujo significativamente ($P<0,05$) los niveles de NO, ERO y TNF- α inducidos en conjunto por el

estímulo con MIF y la infección con *T. cruzi*, llegando inclusive a niveles basales (Fig. 5, A-C).

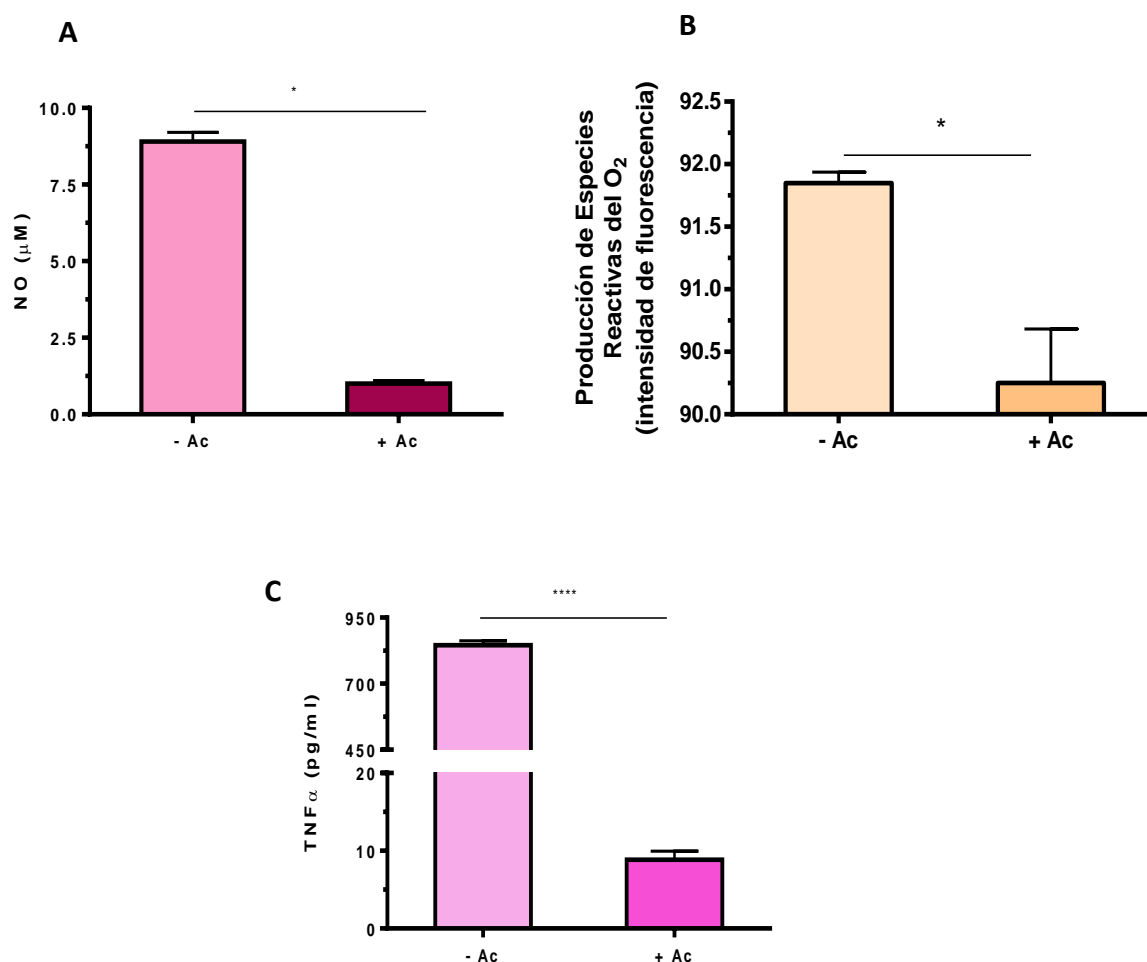


Fig. 5: Mecanismos parasiticidas específicos de MIF. Expresión de NO (A), ERO (B) y $\text{TNF-}\alpha$ (C), en macrófagos murinos infectados con *T. cruzi*, estimulados con 1.000 ng/ml de MIF y tratados o no con un anticuerpo específico anti MIF (Ac) durante 72 hs. Los datos son presentados como el valor medio \pm ESM. * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$.

1.5. Producción de MIF en macrófagos infectados

Para determinar si *T. cruzi* es capaz de inducir la secreción de MIF por células fagocíticas, se infectaron *in vitro* macrófagos peritoneales de ratón con distintas relaciones parásito:célula por 48 hs. Se observó que los fagocitos liberan MIF en relación al número de parásitos utilizados para su infección (Fig. 6). Cuando la relación *T. cruzi*: macrófago fue igual a 1, la concentración promedio de MIF en el sobrenadante de cultivo resultó similar a los niveles basales hallados en macrófagos sin infectar. Al incrementar la cantidad de parásitos por célula (5:1 ó 10:1), la liberación de MIF aumentó

significativamente ($P<0,05$) con respecto al control ($8,83 \pm 1,29$ y $9,20 \pm 2,05$ vs $2,13 \pm 1,21$ ng/ml, respectivamente).

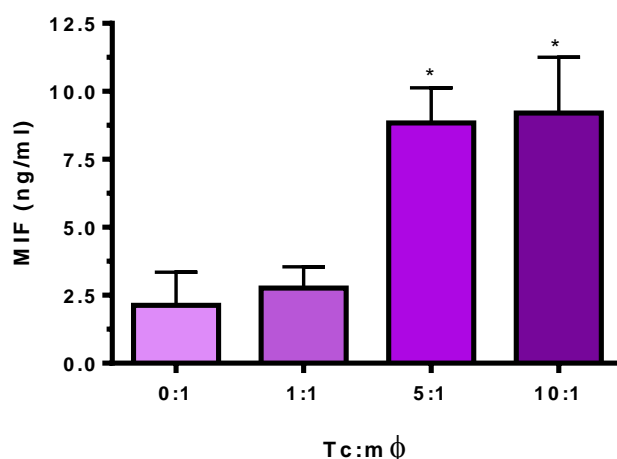


Fig. 6: Liberación de MIF por macrófagos infectados con *T. cruzi*. Niveles de MIF medidos por ELISA en macrófagos peritoneales infectados con distintas relaciones de *T. cruzi*:célula (Tc:mφ). Los datos son presentados como el valor medio \pm ESM. * $P<0,05$ vs 0:1 relación Tc:mφ).

1.6. Caracterización de la infección aguda por *T. cruzi* en ratones

En ratones BALB/c, la infección aguda con la cepa RA de *T. cruzi* se caracterizó por una baja parasitemia a los 7 dpi, alcanzando un valor máximo de $8,6 \times 10^5$ parásitos/ml a los 21 dpi para luego disminuir progresivamente hasta finalizar esta fase (Fig. 7A). Durante el curso de la misma, se evaluó el nivel de parasitismo tisular (Fig. 7A) y la respuesta inflamatoria (evaluada mediante el grado de inflamación, G.I) (Fig. 7B), tanto en corazón como en músculo esquelético. A los 7 dpi, ninguno de estos tejidos evidenció anormalidades histopatológicas ni la presencia de nidos de amastigotes. La inflamación a ese tiempo fue mínima (Fig. 7B). En los animales sacrificados a los 14 dpi, se halló un infiltrado inflamatorio multifocal y difuso (G.I: 1-2), que consistía principalmente en células mononucleares linfoplasmocitarias y macrófagos, con pocas células polimorfonucleares y mastocitos, en el 94,5% de los corazones infectados. El infiltrado inflamatorio se encontraba presente en todo el órgano afectando distintas estructuras cardíacas (endocardio, miocardio y epicardio). En el músculo esquelético, sin embargo, la intensidad de la inflamación fue menos evidente durante este período (G.I: 0-1). El infiltrado inflamatorio se intensificó y se volvió más extenso entre los 21 y 28 dpi (G.I: 3-4; Fig. 7B y microfotografía 2, B y D). El máximo parasitismo en ambos tejidos coincidió con el pico de parasitemia, la máxima severidad de la miocarditis y la presencia de una intensa rabdomiólisis en el 75% de las muestras de músculo esquelético. Se identificaron

numerosos nidos de amastigotes (B inserto) y focos inflamatorios (D inserto) en la pared de los ventrículos, involucrando los ganglios autonómicos y el tejido sub-pericárdico. No se encontraron signos de inflamación en ninguna de las muestras de los ratones control.

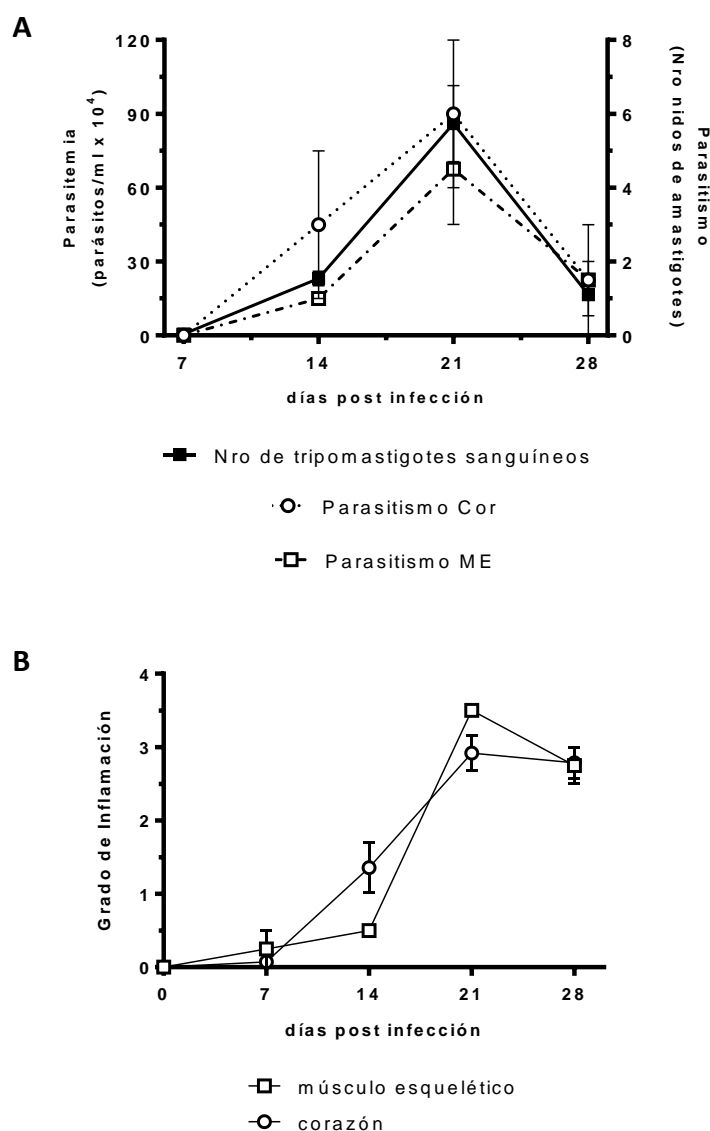
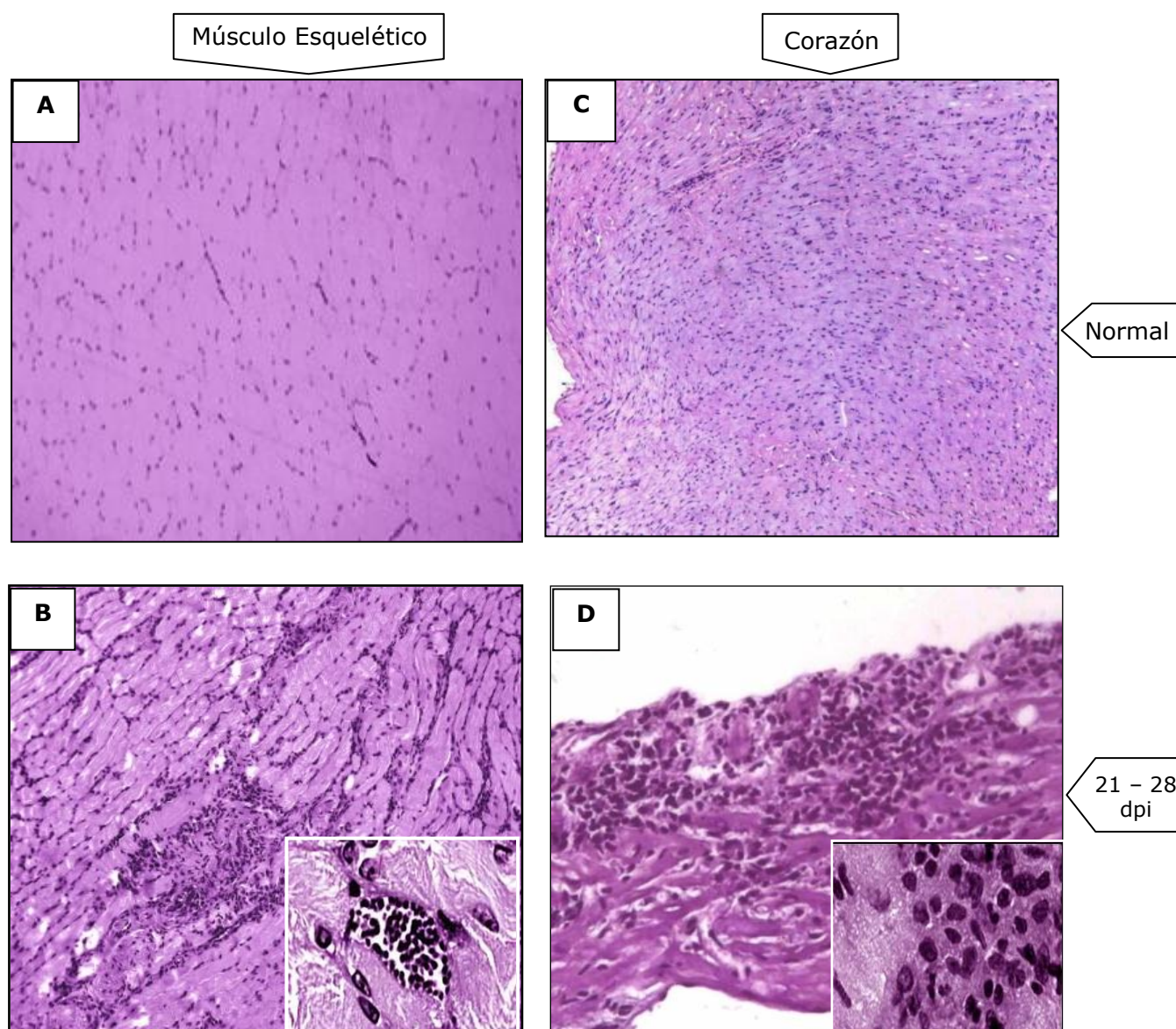


Fig. 7: Perfil de parasitemia, parasitismo tisular (A) y grado de inflamación (B) en el corazón (Cor) y músculo esquelético (ME) de ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi*. Se inició el control al día 7 post-infección, continuando con el monitoreo hasta finalizar la etapa aguda, a los 28 dpi. Se obtuvieron de cada animal 5 μ l de sangre para evaluar la parasitemia y una muestra de tejido cardíaco y de músculo esquelético para la visualización de los nidos de amastigotes y la extensión e intensidad de los infiltrados inflamatorios. Los resultados obtenidos se expresan como el valor medio del número de parásitos y del G.I en cada uno de los dpi \pm ESM.



Microfotografía 2: Parasitismo tisular en la etapa aguda experimental.

Microfotografías representativas de tejidos (**A y B**: músculo esquelético, ME; **C y D**: corazón) de ratones Balb/c infectados con la cepa RA de *T. cruzi*. Se observan intensos infiltrados inflamatorios (grado 3-4) en ME (**B**, 20X) y corazón (**D**, 40X) entre los días 21 y 28 dpi. No se observaron infiltrados inflamatorios de grado 4 en ninguna de las muestras histológicas evaluadas. **B inserto**: detalle de nido de amastigotes intacto en ME (100X). **D inserto**: detalle de foco inflamatorio en tejido cardiaco (100X). **A y C**: muestras de ME y corazón de ratones control (20X). Tinción hematoxilina-eosina. Las microfotografías son representativas de 3 experimentos independientes.

1.7. Expresión de MIF en la etapa aguda de la infección experimental

En un modelo *in vivo* de infección temprana por *T. cruzi*, se evaluó la cinética de la expresión del ARNm de MIF en músculo esquelético y miocardio (Fig. 8, A y B). Sólo una

expresión basal de MIF fue demostrada en muestras de ratones sin infectar. En ambos tejidos, se observó un incremento en el nivel de transcriptos de la CQ durante el curso de la infección. A los 7 dpi, la expresión de MIF en el músculo esquelético fue muy intensa, al igual que la hallada en el miocardio. La expresión del ARNm de este mediador estuvo persistentemente aumentada en ambos tipos de músculo a lo largo de toda la fase aguda, si bien en corazón se redujo ligeramente al llegar a los 28 dpi. Los resultados de esta mayor expresión local de ARNm fueron confirmados con la identificación por IHQ de la proteína MIF en los órganos blanco (Microfotografía 3). La expresión elevada de esta CQ se localizó fundamentalmente en las células musculares de ambos tejidos (Microfotografía 3 B y E, flechas), observándose además una marcada expresión de MIF en los leucocitos constituyentes del infiltrado inflamatorio (Microfotografía 3 C, flechas).

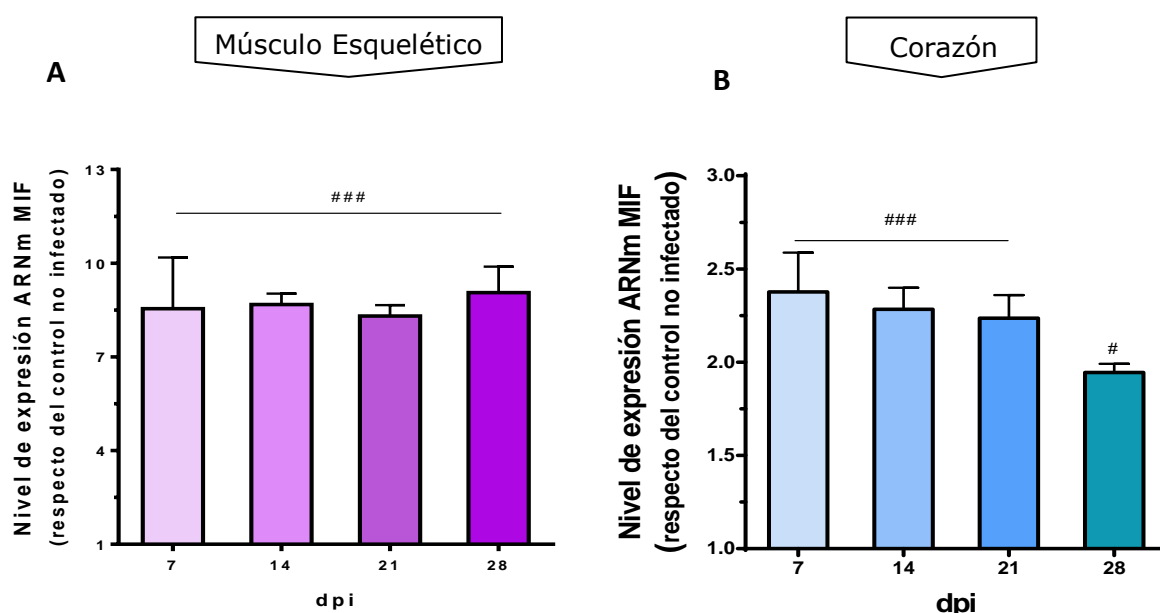
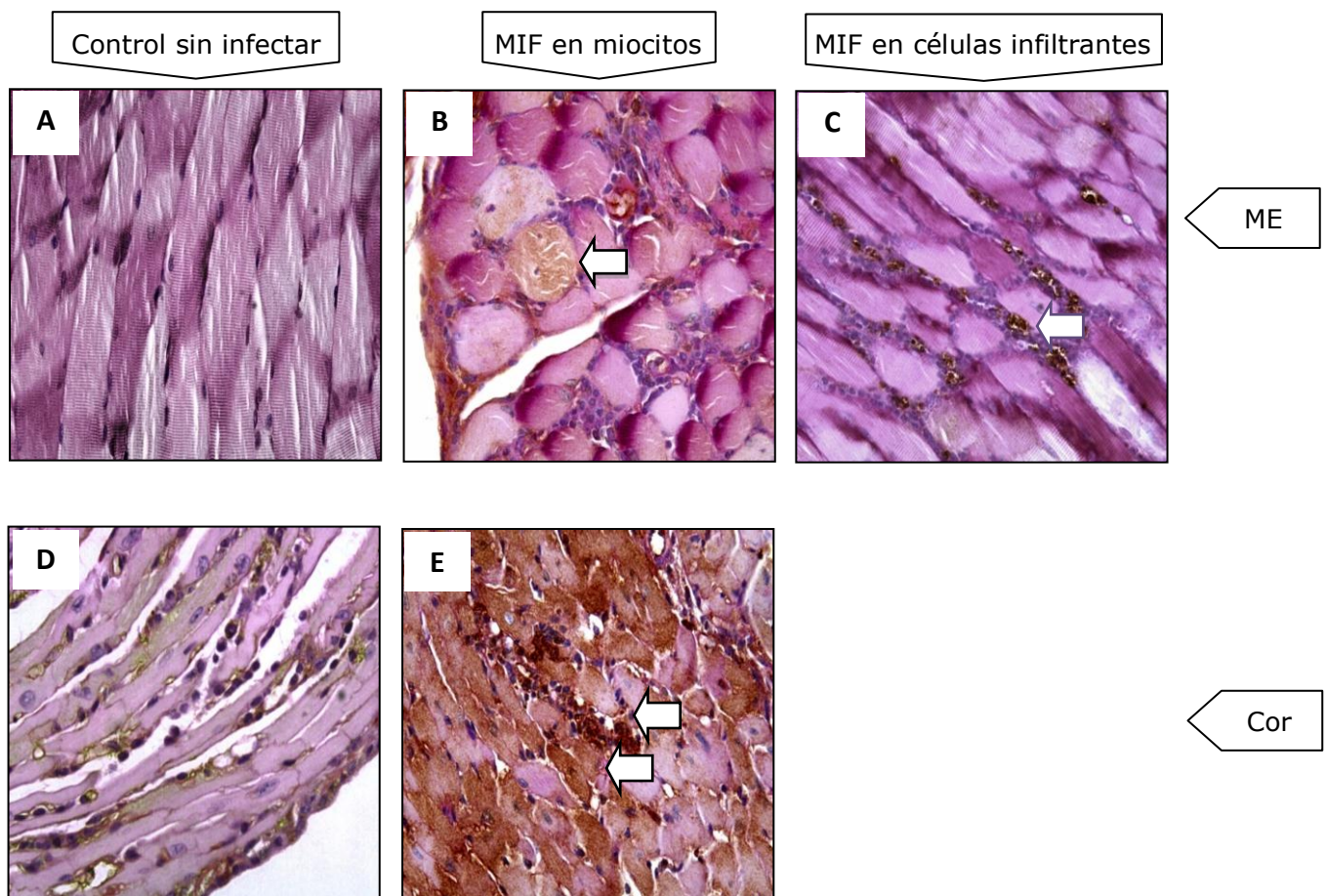


Fig. 8: Cinética de la expresión muscular de ARNm de MIF en la etapa aguda experimental. Los ratones fueron infectados con 50 tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi* y sacrificados a los tiempos indicados. El músculo esquelético **(A)** y el corazón **(B)** fueron extraídos y analizados para la expresión del ARNm de MIF. El análisis semi-cuantitativo de la expresión de los ARNm corresponde a los resultados de RT-PCR. El nivel de expresión, presentado como el valor medio \pm ESM, se define como la relación entre la señal obtenida para el transcripto analizado (corregido según el valor de la β -actina de la misma muestra) y la señal obtenida para dicho transcripto en los animales control. $###P<0,001$ diferencias entre los grupos de animales infectados y control.



Microfotografía 3: Expresión de MIF en tejidos infectados con *T. cruzi* en etapa aguda. Microfotografías representativas de la expresión de la proteína de MIF en músculo esquelético –ME- (**A, B y C**) y corazón –Cor- (**D y E**) de ratones Balb/c infectados con la cepa RA de *T. cruzi* cursando la etapa aguda de la enfermedad. Se observa una intensa coloración tanto en los miocitos (**B y E**, flechas) como en las células infiltrantes (**C**, flecha). No se observó expresión de MIF en las muestras de ME de ratones sin infectar (**A**), o se detectó en forma basal en tejido cardíaco (**D**). Las microfotografías son representativas de 3 experimentos independientes. Aumento de todas las microfotografías: 40X.

1.8. Niveles de MIF en el suero de pacientes pediátricos en etapa aguda de la infección

En un grupo de 8 pacientes pediátricos por debajo de la edad de 2 meses, con parasitemia detectable por microhematocrito (fase aguda de la infección chagásica), se investigaron los niveles séricos de MIF. Se encontró que la concentración promedio de MIF circulante en estos niños era significativamente mucho más elevada ($P=0,006$) que la determinada en muestras de pacientes pediátricos no infectados con *T. cruzi*, quienes

sólo presentaban valores basales de este mediador inflamatorio ($42,92 \pm 12,35$ vs $2,92 \pm 0,48$ ng/ml, respectivamente) (Fig. 9).

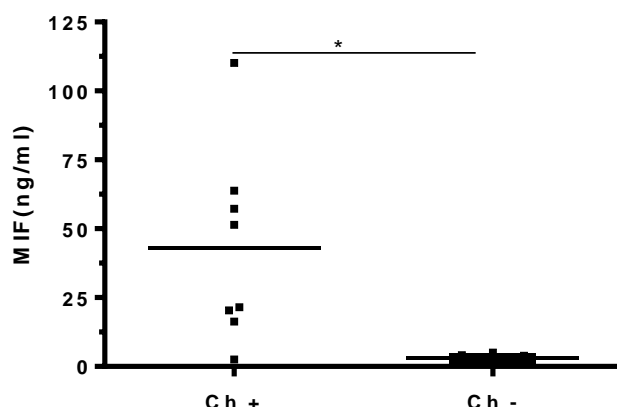


Fig. 9: Niveles circulantes de MIF en pacientes pediátricos cursando la etapa aguda de la enfermedad. Muestras de suero de niños menores de 2 meses de vida con parasitemia positiva y niños no infectados de la misma edad fueron utilizadas para la cuantificación de MIF por el método de ELISA. Los resultados se expresan como el valor medio. * $P < 0,05$ niños positivos para *T. cruzi* (Ch+) vs no infectados (Ch-).

2. Papel de MIF en los mecanismos de inflamación que se desarrollan en la etapa crónica de la infección con *T. cruzi*

2.1. Expresión de MIF en la etapa crónica indeterminada y severa de la infección experimental y humana

En ratones:

En el sistema cardiovascular, la inducción de MIF en respuesta a la infección experimental, tanto a nivel del ARNm como de la proteína, fue estudiada por PCR e IHQ, respectivamente (Fig. 10).

Utilizando el modelo murino de etapa crónica severa de la enfermedad, a los 120 dpi se evidenció una intensa inducción de la CQ, cuya mayor expresión se localizaba principalmente en cardiomiocitos, en coincidencia con un elevado grado de parasitismo e infiltración leucocitaria en corazón²⁴⁵ (Fig. 10C). Las células del infiltrado inflamatorio también mostraron reactividad, aunque en menor proporción (Fig. 10C, flecha).

Usando el modelo experimental de etapa indeterminada, MIF fue asimismo identificado, aunque de manera mucho más difusa, en el tejido cardíaco de ratones por detección del ARNm y de su proteína (Fig. 10, A y B). Sólo se pudo comprobar una débil expresión basal del mediador en los animales control (Fig. 10D).

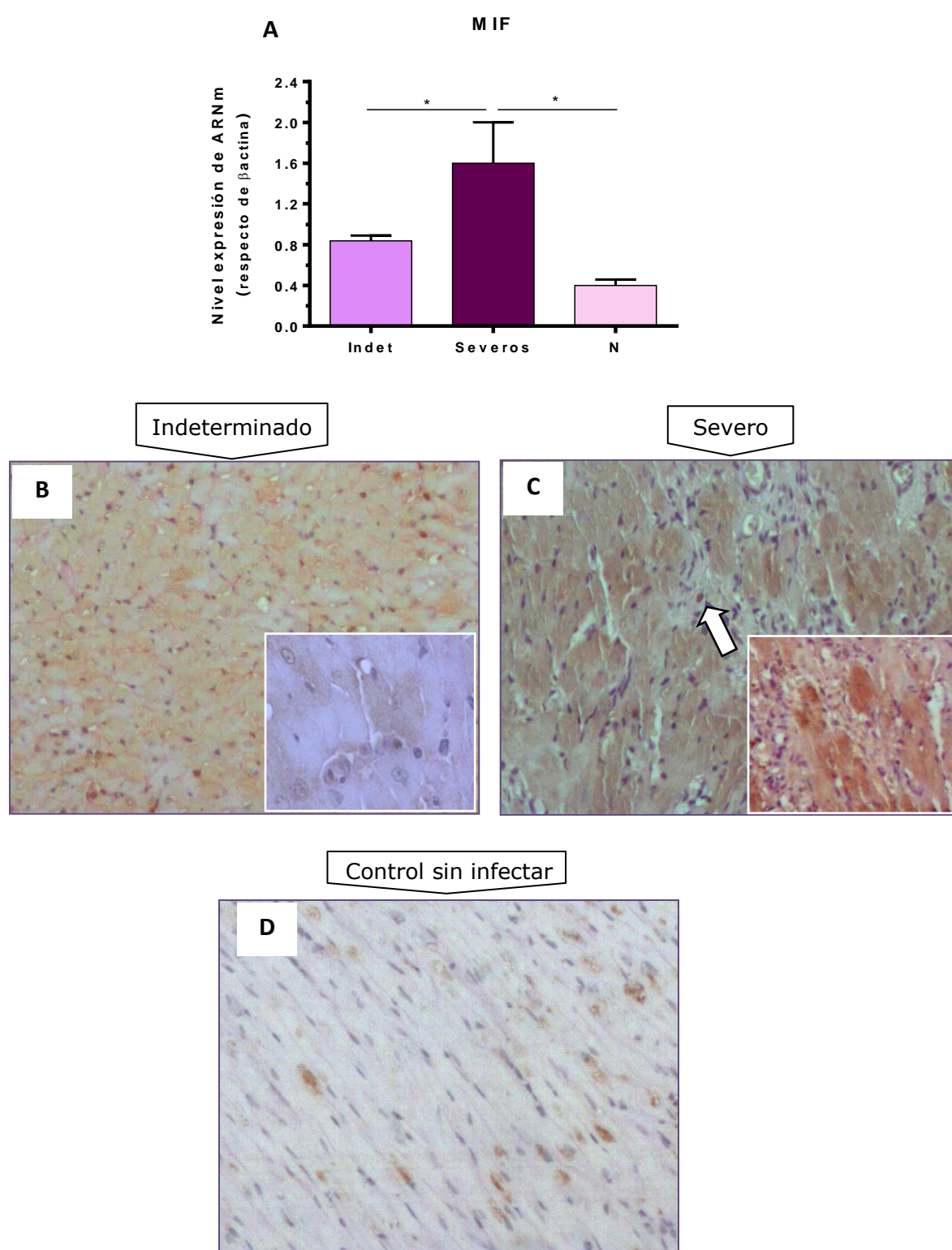


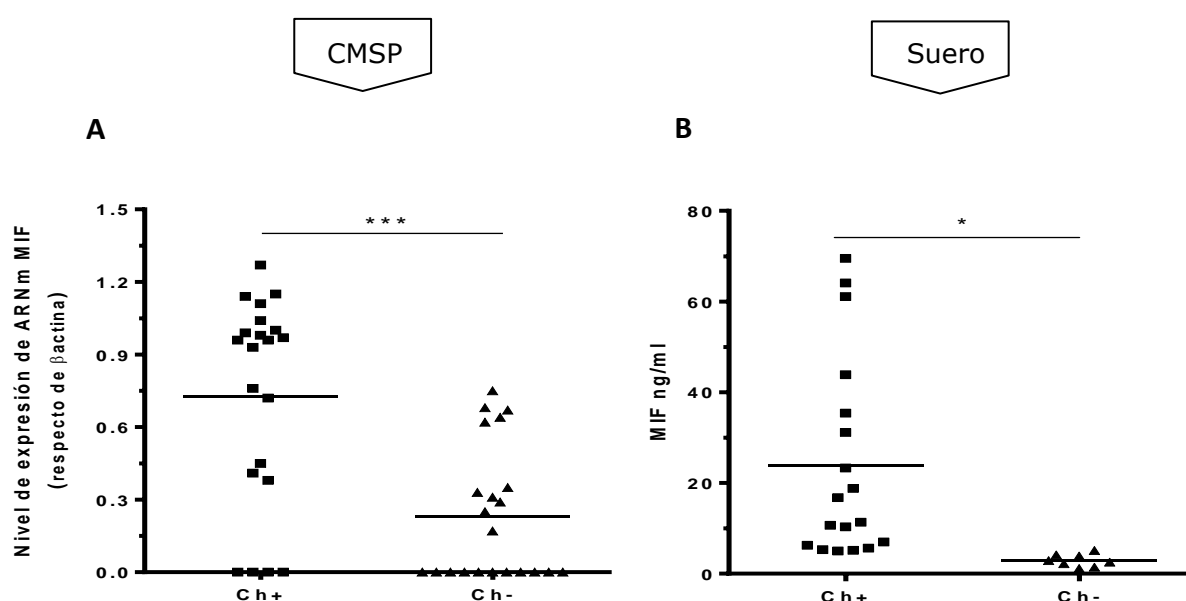
Fig. 10: Expresión de MIF en la etapa crónica de la infección experimental.

Niveles de ARNm (**A**) y la proteína (**B-D**) de MIF en tejido cardíaco de animales cursando la fase crónica indeterminada (**B**) y severa (**C**) de la enfermedad de Chagas. Ratones de la cepa C3H fueron infectados con distintas cepas del parásito (Tulahuén y Sylvio) para generar los modelos de

las diferentes etapas de la infección (indeterminada y severa, respectivamente). **B inserto:** expresión basal de MIF (100X). **C:** sólo unas pocas células infiltrantes expresaron MIF (flecha) mientras se registró una intensa marcación en cardiomiocitos (**inserto**, 40X). **(D)** marca basal de MIF en una muestra de tejido cardíaco normal (40x). * $P < 0,05$, severos vs indeterminados (Indet) y normales (N). Aumento de microfotografías A, B y C: 40X.

En pacientes:

En primera instancia, se estudió la expresión de MIF en un grupo de pacientes pediátricos en estadio indeterminado temprano, antes de que recibieran el tratamiento parasiticida. En CMSP de estos pacientes se detectaron niveles significativamente más elevados ($P < 0,001$) de ARNm de MIF, comparados con los hallados en niños no infectados ($0,72 \pm 0,09$ vs $0,23 \pm 0,06$ unidades, respectivamente) (Fig. 11A). En concordancia, los primeros presentaron cantidades incrementadas ($P < 0,05$) de la proteína en suero, respecto de la población libre de infección ($23,9 \pm 5,2$ vs $2,9 \pm 0,5$ ng/ml, respectivamente) (Fig. 11B). Algo similar se encontró con respecto a otra CQ proinflamatoria emblemática, como IFN- γ . Los pacientes pediátricos en estadio indeterminado temprano evidenciaron niveles significativamente más altos ($P < 0,05$) de ARNm de IFN- γ en CMSP, comparado con los transcritos presentes en células de niños no infectados ($0,60 \pm 0,09$ vs $0,19 \pm 0,06$ UA, respectivamente) (Fig. 11C). Coincidentemente, aquéllos presentaron una mayor concentración ($P < 0,05$) de la CQ circulante, respecto de estos últimos ($20,6 \pm 4,9$ vs $5,3 \pm 1,2$ ng/ml, respectivamente) (Fig. 11D).



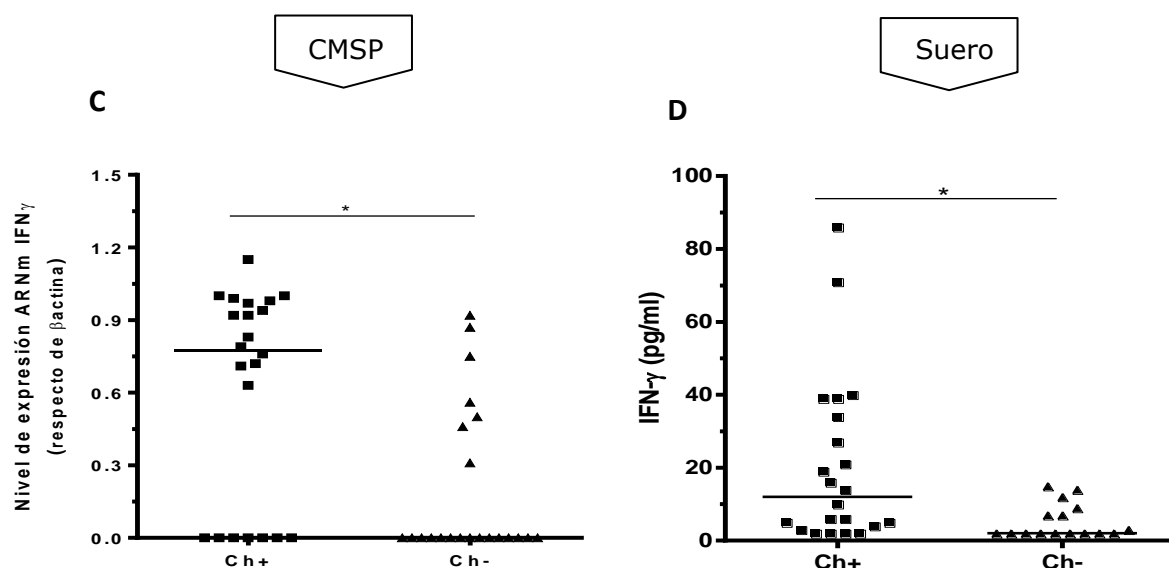


Fig. 11: Expresión de MIF e IFN- γ en pacientes pediátricos en estadio indeterminado temprano. Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes pediátricos en la etapa indeterminada temprana de la enfermedad y de niños no infectados. Se midieron los niveles de ARNm en células mononucleares –CMSP- (**A y C**) y proteína circulante (**B y D**) de MIF e IFN- γ , respectivamente. Los resultados se expresan como el valor medio. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, pacientes infectados vs no infectados.

Por otro lado, se investigó el nivel de MIF circulante durante la fase crónica indeterminada y sintomática de la infección chagásica humana. En las muestras de pacientes adultos cursando distintos grados de patología cardíaca [indeterminado (G0) y severo (G3)] se hallaron diferencias entre ambos grupos en la concentración sérica de MIF (Fig. 12). Los pacientes con miocardiopatía severa por ECh presentaron niveles de MIF aumentados en forma significativa en comparación con los registrados en aquellos pacientes en etapa indeterminada tardía ($20,9 \pm 5,1$ vs $7,4 \pm 0,6$ ng/ml, respectivamente) (Fig. 12A). Los valores de MIF en suero de este último grupo no difirieron mayormente de los detectados en las muestras de individuos no infectados ($8,1 \pm 1,6$ ng/ml). La concentración sérica promedio en G3 es comparable con la encontrada previamente [$19,8$ ng/ml²⁴⁷] en pacientes con tuberculosis pulmonar. También en las muestras de pacientes adultos infectados con distintos grados de patología cardíaca se evaluaron los niveles de una CQ asociada con la fisiopatología de Chagas, como TNF- α . En conjunto, los individuos infectados, sin y con evidencias de miocardiopatía, presentaron concentraciones promedio de TNF- α significativamente más elevadas que los sujetos no infectados ($324,6 \pm 41,4$ y $344,3 \pm 79,4$ vs $146,9 \pm 14,8$ ng/ml, respectivamente; Fig. 12B). Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido con MIF, no se hallaron diferencias entre los valores correspondientes a los estadios indeterminado y severo ($P > 0,05$). Tampoco se verificó que existiera correlación significativa entre los

niveles de MIF y TNF- α , posiblemente debido a que existan mecanismos regulatorios diferenciales para cada mediador a lo largo del curso de infección.

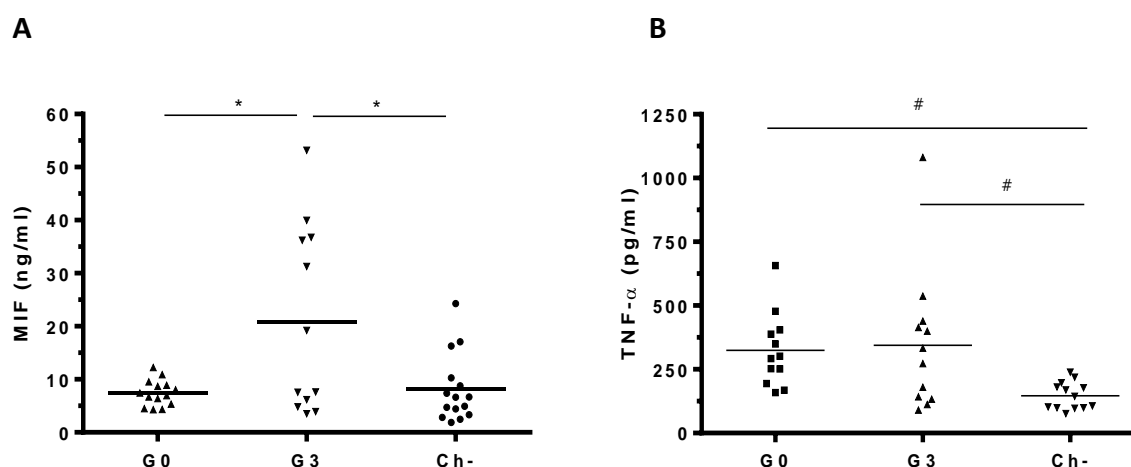


Fig. 12: Expresión incrementada de MIF en pacientes con miocardiopatía chagásica severa. Pacientes adultos con enfermedad de Chagas fueron agrupados de acuerdo a la presencia o no de patología cardíaca: etapa crónica severa (G3) e indeterminada (G0), respectivamente. Se presentan los niveles séricos de MIF **(A)** y TNF- α **(B)** de los distintos grupos de pacientes chagásicos e individuos no infectados (Ch-). Los resultados se expresan como el valor medio. * $P < 0,05$ G3 vs G0 y Ch-; # $P < 0,05$ G0 y G3 vs Ch-.

2.2. Correlación del nivel circulante de MIF con parámetros ecocardiográficos y de laboratorio representativos de daño cardíaco

En la Tabla III se observa que tanto la edad como el género de la población de pacientes adultos en quienes se determinó la concentración de MIF circulante muestran una distribución desigual. La edad promedio del grupo con patología severa es significativamente diferente ($P < 0,05$) de la que presentan los pacientes indeterminados y los controles sin infección. La distribución con respecto al sexo también está desbalanceada, con una disminución muy marcada ($P < 0,0001$) de la proporción de mujeres dentro del grupo de pacientes infectados con miocardiopatía grave. Además, en este grupo se registraron alteraciones muy significativas ($P < 0,001$) de diversos parámetros ECO (Tabla III). Por lo tanto, se practicó un análisis de regresión múltiple que comprendió a los valores de MIF, la edad, el sexo y la forma clínica de la ECh con el propósito de verificar la influencia de las variables independientes sobre los niveles de la CQ proinflamatoria. Los resultados mostraron que en la población en estudio no existía correlación significativa entre la concentración de MIF circulante y edad, sexo o estadio indeterminado de la infección ($P = 0,106$, $0,223$ y $0,556$, respectivamente). Por el

contrario, el análisis estadístico confirmó la hipótesis de que los valores de MIF hallados correlacionan significativamente y de modo positivo con la forma más avanzada de miocardiopatía chagásica crónica.

	Individuos No infectados (n=15)	Pacientes Chagas Indet (G0, n=14)	Pacientes Chagas Severo (G3, n=12)	Valor de <i>P</i>
Características				
Edad (años)	47,3±1,4	51,9±1,7	57,3±6,8	<0,05
Sexo (F/M)	8/7	10/4	1/11	<0,01
Estudios Ecocardiográficos				
DDVI (cm)	4,4 ± 0,2	4,4 ± 0,1	6,4 ± 0,3	<0,001
DSVI (cm)	2,5 ± 0,3	2,5 ± 0,1	5,2 ± 0,3	<0,001
FA (%)	38,0 ± 4,0	44,0 ± 1,8	17,0 ± 3,4	<0,001
SI (cm)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	>0,05
PP (cm)	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	>0,05
DAI (cm)	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,1	4,9 ± 0,3	<0,001
DA (cm)	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,2 ± 0,1	<0,001
Estudios Electrocardiográficos				
Anormalidades presentes (% de pacientes)	0,0	0,0	100,0	

TABLA III: Características clínicas de la población adulta estudiada. Distribución de edad y sexo y parámetros eco y electrocardiográficos en pacientes chagásicos crónicos e individuos no infectados. DDVI: diámetro diastólico del ventrículo izquierdo; DSVI: diámetro sistólico del ventrículo izquierdo; FA: fracción de acortamiento; SI: septum interventricular; PP: pared posterior; DAI: diámetro de la auricular izquierda; DA: diámetro de la aorta.

Particularmente, los valores séricos de MIF en pacientes con infección crónica por *T. cruzi* correlacionaron con parámetros ECO indicadores de disfunción ventricular izquierda, uno de los signos clínicos característicos de la patología chagásica cardíaca²⁴⁸ (Fig. 13). La concentración de la CQ presentó una significativa correlación positiva con los

diámetros DDVI ($r=0,54$, $P=0,004$), DSVI ($r=0,56$, $P=0,031$), DAI ($r=0,50$, $P=0,010$) y DA ($r=0,45$, $P=0,010$) (Fig. 13 A, B, C y D, respectivamente). Además, MIF correlacionó negativamente con la disminución de la FA ($r=-0,45$, $P=0,022$) (Fig. 13E). Más aún, los niveles circulantes de MIF de los individuos infectados con *T. cruzi* mostraron una muy significativa correlación positiva ($r= 0,75$, $P<0,0001$) con los valores de PCR-AS, un biomarcador sérico ligado a la severidad de la patología cardíaca en la Ech²⁴⁹ (Fig. 14).

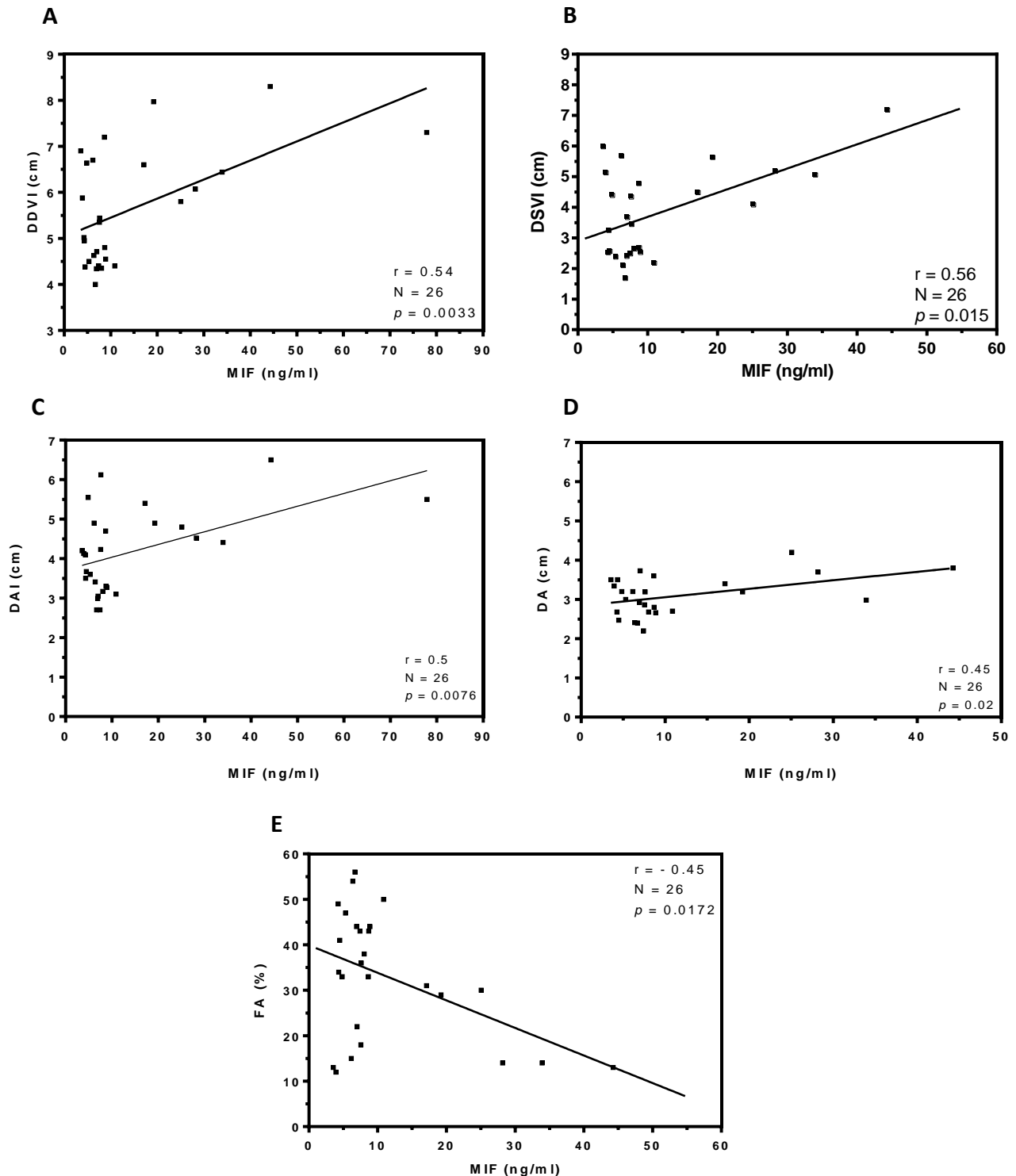


Fig. 13 (página anterior): MIF correlaciona con parámetros ecocardiográficos indicadores de disfunción ventricular izquierda. Las variables utilizadas habitualmente para evidenciar patología ventricular izquierda fueron estudiadas en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica (N=26). Paralelamente, se midieron por ELISA los niveles de MIF circulante en muestras de suero de los mismos pacientes. En cada caso se indican los valores de p y r (coeficiente Pearson) de correlación.

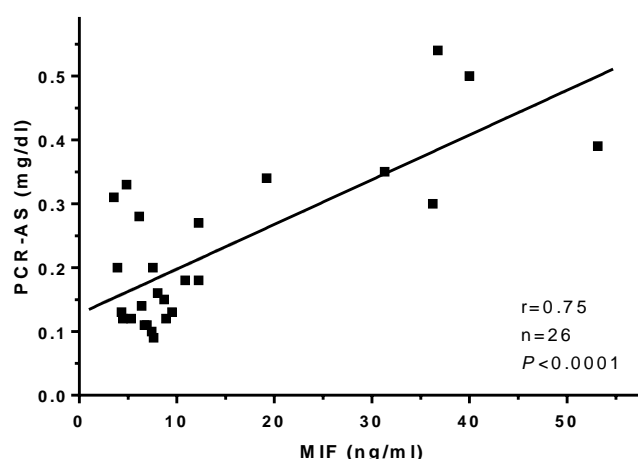


Fig. 14: Correlación entre los niveles séricos de MIF y de proteína C reactiva de alta sensibilidad. El grupo de pacientes adultos en estudio fue evaluado por inmunonefelometría para la detección de proteína C reactiva (PCR-AS) circulante. Se estableció una comparación entre las concentraciones halladas y los niveles séricos de MIF de cada individuo. Se indican los valores de P y r (coeficiente Pearson) de correlación entre las variables.

2.3. Papel de MIF en la regulación de la apoptosis de cardiomiocitos generada por la infección con *T. cruzi*

Se estudió el efecto de MIF como posible regulador de la apoptosis en cardiomiocitos murinos HL-1 infectados con *T. cruzi*. En primer lugar se verificó que, en ausencia de infección, MIF no provoca un efecto pro-apoptótico sobre este tipo celular, ya que no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para la técnica de TUNEL entre aquellas tratadas con la CQ y las que no recibieron tratamiento ($13,1 \pm 3,9\%$ vs $12,0 \pm 1,7\%$, respectivamente) (Fig. 15A). En concordancia con dicho resultado, los datos correspondientes al análisis por citometría de flujo mostraron que tampoco se registraban modificaciones sustanciales del parámetro *Forward Scatter*, representativo del tamaño celular (Fig. 15B). La infección con *T. cruzi*, en cambio, incrementó significativamente ($P<0,05$) la muerte celular programada y el

“encogimiento” de las células HL-1 respecto a aquellas sin infectar ($29,4 \pm 3,7$ y $12,0 \pm 1,7$ % vs $1.475,0 \pm 22,5$ % y $1.562,0 \pm 12,7$, respectivamente) (Fig. 15, C y D).

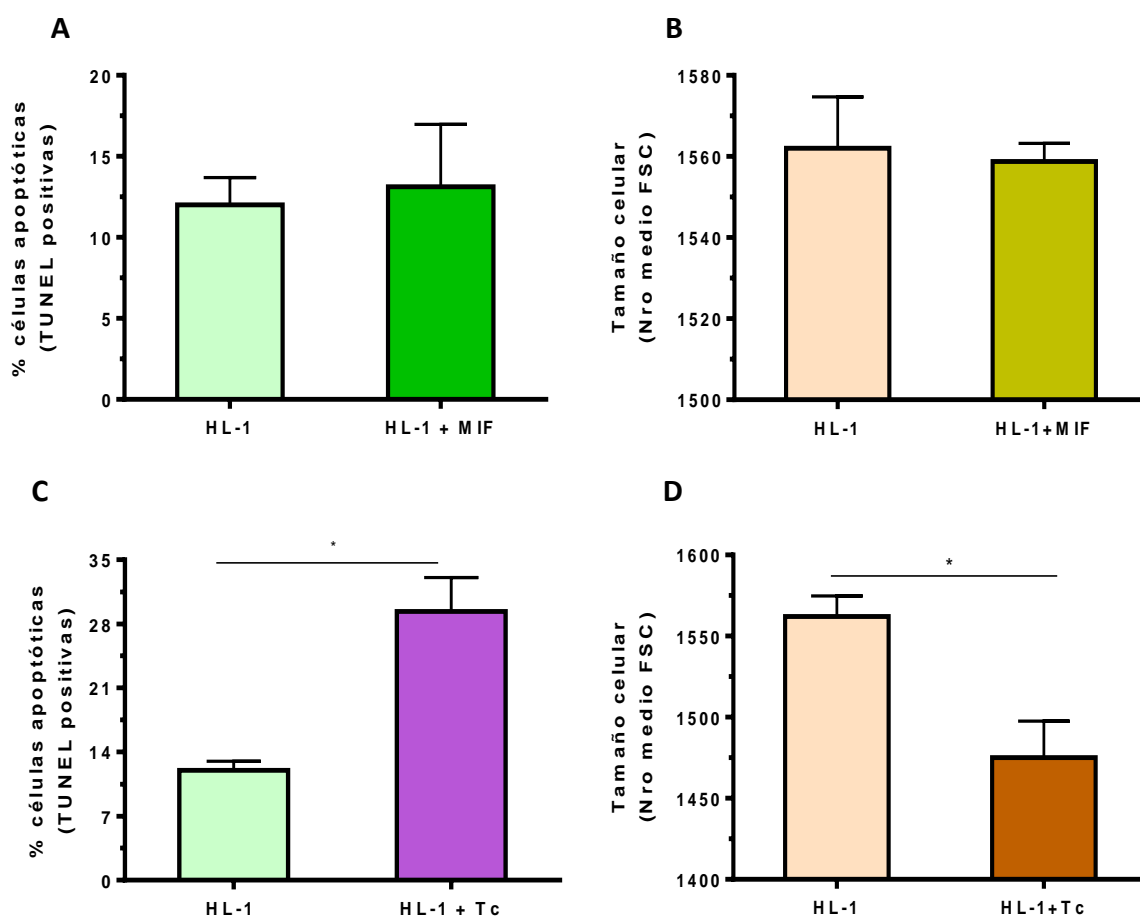


Fig. 15: Apoptosis de cardiomiocitos luego del tratamiento con MIF o de la infección con *T. cruzi*. Cardiomiocitos murinos HL-1 fueron estimulados con 30 ng/ml de MIF o infectados en una relación parásito/célula de 5:1, y al cabo de 24 hs se registró el porcentaje de células apoptóticas por la técnica de TUNEL (**A** y **C**) y se analizó el tamaño celular por citometría de flujo (**B** y **D**). Los valores son representativos de 3 ensayos independientes. Se expresan como el valor medio \pm ESM. * $P < 0,05$; HL-1 vs HL-1 infectadas (+Tc).

Al estudiar el efecto de MIF sobre los cardiomiocitos infectados, se evidenció una notable reducción ($P = 0,0004$) en el número de células positivas por TUNEL como consecuencia del tratamiento con este factor proinflamatorio, respecto de aquellas solamente infectadas ($2,5 \pm 0,6$ vs $29,4 \pm 3,7$ %, respectivamente) (Fig. 16A). Así también, estas últimas presentaban un tamaño significativamente ($P < 0,05$) menor que las tratadas con MIF ($1.475,0 \pm 22,5$ vs $1.530 \pm 8,4$, respectivamente) (Fig. 16B). Estos hallazgos sugieren que MIF podría revertir la apoptosis de cardiomiocitos generada por la infección con *T. cruzi*.

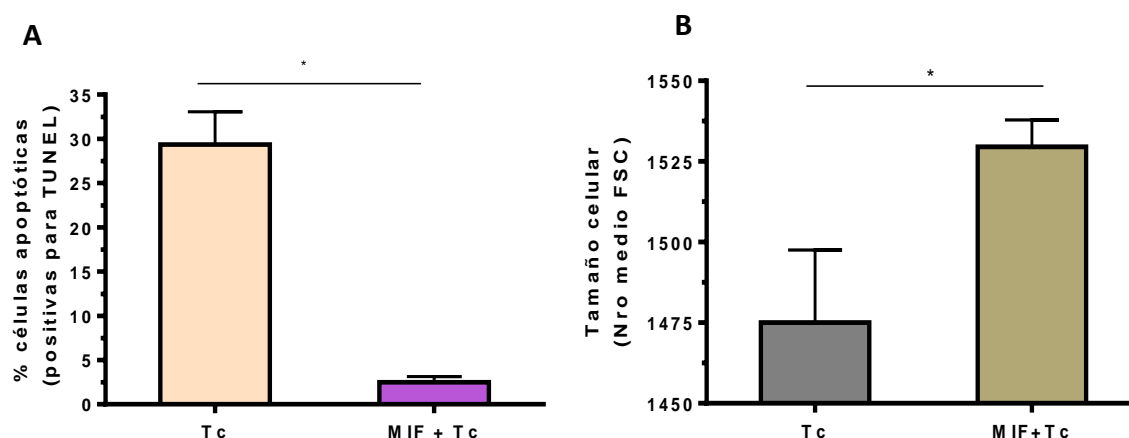


Fig. 16: Regulación mediada por MIF de la apoptosis de cardiomiocitos inducida por *T. cruzi*. Cardiomiocitos murinos fueron estimulados o no con 30 ng/ml de MIF e infectados en una relación parásito/célula de 5:1 por 24 hs. Luego se registró el porcentaje de células apoptóticas por la técnica de TUNEL (**A**) y se midió el tamaño celular por citometría de flujo (**B**). Los valores son representativos de 3 ensayos independientes. Se expresan como el valor medio \pm ESM. * $P < 0,05$; MIF+Tc vs Tc.

3. Entorno inflamatorio que acompaña a MIF en las distintas etapas de la infección con *T. cruzi*

3.1. Expresión de mediadores inflamatorios en corazón y músculo esquelético de ratones infectados en etapas aguda y crónica

La fase aguda de la infección experimental se caracterizó por una importante expresión de mediadores proinflamatorios, tanto en corazón como en músculo esquelético (Figs. 17-19). Se evidenció una inducción de distintas CQ, QQ y sus receptores desde la primera semana post-infección (pi) hasta el final de la etapa aguda (28 dpi). En el corazón de los ratones infectados se observó un incremento significativo de transcritos para TNF- α (Fig. 17D), CCL5 junto con su receptor CCR5, y CXCL9 (Figs. 18B, 19B y 18D, respectivamente) desde el día 7 pi. Sin embargo, y en concordancia con lo detallado por otros autores²⁵⁰, IFN- γ no fue inducido en el tejido cardíaco a este tiempo (Fig. 17B), como tampoco CXCR3, receptor de CXCL9 (Fig. 19D). En el músculo esquelético no se detectó ARNm de IFN- γ y TNF- α en la primera semana de infección (Fig. 17 A y C, respectivamente), pero en cambio sí transcritos de CCL5 y CXCL9 (Fig. 18A y C), como así también de sus receptores, CCR5 y CXCR3, cuya expresión aumentó significativamente en ese lapso ($P < 0,001$) (Fig. 19A y C). En las muestras de las semanas subsiguientes se observó en ambos tejidos un incremento de la expresión de todos los mediadores estudiados (14 dpi), sostenido hasta el pico de parasitemia (21

dpi). Hacia la finalización del período agudo, la expresión de transcritos para los factores proinflamatorios analizados en el tejido cardíaco aún se mantuvo en niveles elevados. De modo diferencial, luego de 4 semanas de infección, los ARNm para IFN- γ y CCR5 redujeron su expresión en el músculo esquelético hasta niveles basales, indistinguibles de los hallados en los controles no infectados.

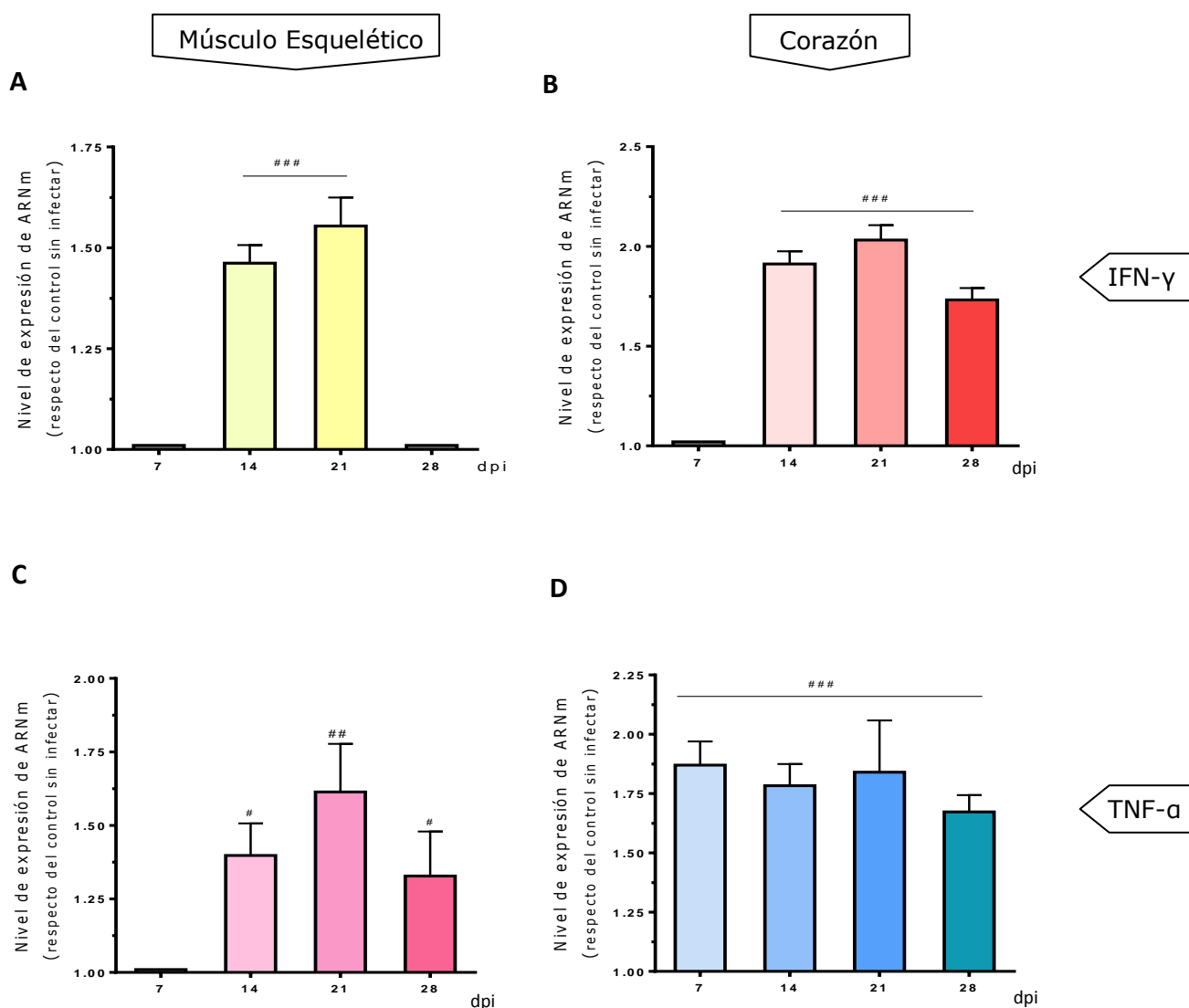


Fig. 17: Expresión muscular de citoquinas proinflamatorias que acompañan a MIF en la etapa aguda de la infección experimental. Los ratones fueron infectados con 50 tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi* y sacrificados a los tiempos indicados. Se tomaron muestras de músculo esquelético y corazón donde se verificó la expresión del ARNm de las CQ proinflamatorias IFN- γ (A y B) y TNF- α (C y D) respectivamente. El análisis semi-cuantitativo de la expresión de los ARNm corresponde a los resultados de RT-PCR. El nivel de expresión, presentado como el valor medio \pm ESM, se define como la relación entre la señal obtenida para el transcrito analizado (corregido según el valor de la β -actina de la misma muestra) y la señal obtenida para

dicho transcripto en los animales control. # $P<0,05$, ## $P<0,01$, ### $P<0,001$; diferencias entre los grupos de animales infectados y control.

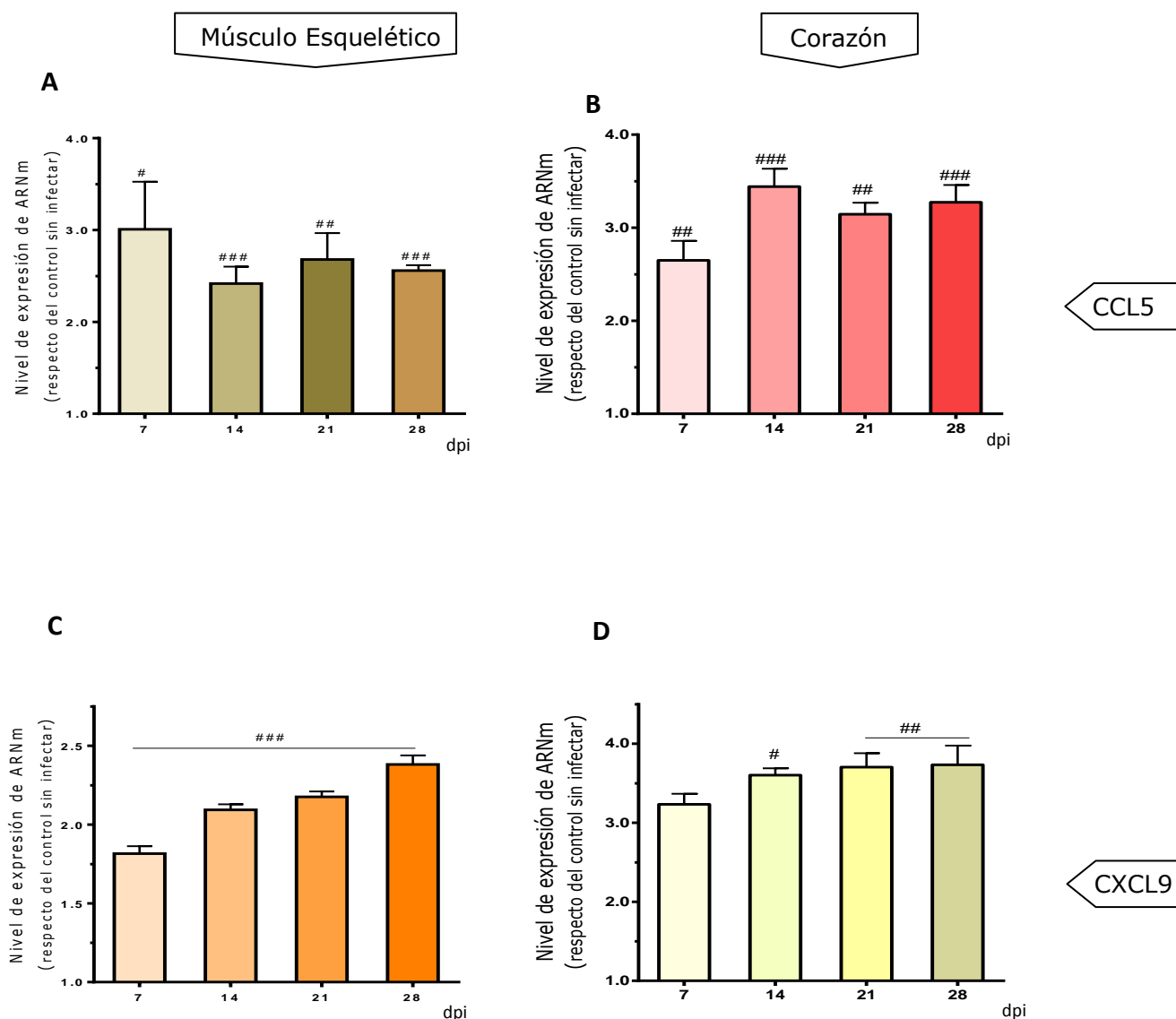


Fig. 18: Expresión muscular de quimioquinas proinflamatorias que acompañan a MIF en la etapa aguda de la infección experimental. Los animales fueron infectados y sacrificados como se mencionó en la figura anterior. Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de las QQ CCL5 (**A** y **B**) y CXCL9 (**C** y **D**) en músculo esquelético y corazón (respectivamente). Los gráficos indican el valor medio \pm ESM. # $P<0,05$, ## $P<0,01$, ### $P<0,001$; diferencias entre los grupos de animales infectados y control.

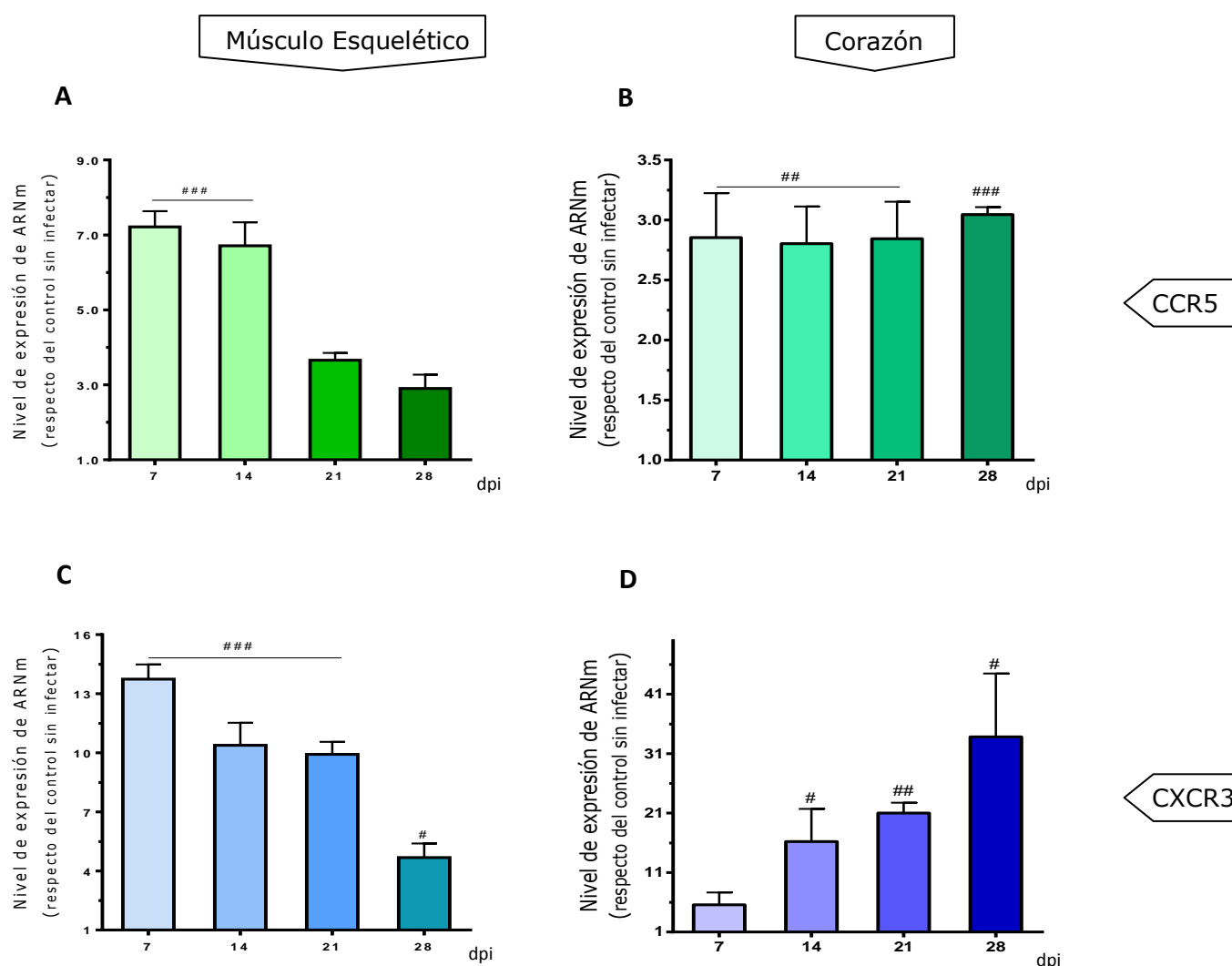


Fig. 19: Expresión muscular de los receptores para quimioquinas proinflamatorias que acompañan a MIF en la etapa aguda de la infección experimental. Los animales fueron infectados y sacrificados como se mencionó en la figura 17. Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de CCR5 (**A** y **B**) y CXCR3 (**C** y **D**) en músculo esquelético y corazón. Los gráficos indican el valor medio \pm ESM. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$; diferencias entre los grupos de animales infectados y control.

Para confirmar que los distintos niveles de expresión génica observados se reflejaban también en una expresión diferencial de las proteínas correspondientes y su relevancia biológica, se llevó a cabo una evaluación inmunohistoquímica de algunos de estos mediadores proinflamatorios. Por ejemplo, de manera análoga a lo descrito para MIF (ver ítem 1.7. de Resultados), se encontraron niveles aumentados de CCL5 y su receptor CCR5 (Figs. 20 y 21, respectivamente) en lesiones de miocardio y músculo estriado causadas por la infección aguda con *T. cruzi* en ratones. La inmunorreactividad para CCL5 se detectó a los 21 dpi, tanto en miocitos (cardíacos o esqueléticos) (Fig. 20 B

y E, respectivamente), como en los leucocitos que infiltraban los tejidos (Fig. 20 C y E). En la musculatura estriada, se verificó expresión del receptor CCR5 en ambos tipos celulares a los 14 dpi, mientras que en miocardio la señal se localizó en el infiltrado inflamatorio pero no en las miofibras (Fig. 21 D-E y B, respectivamente).

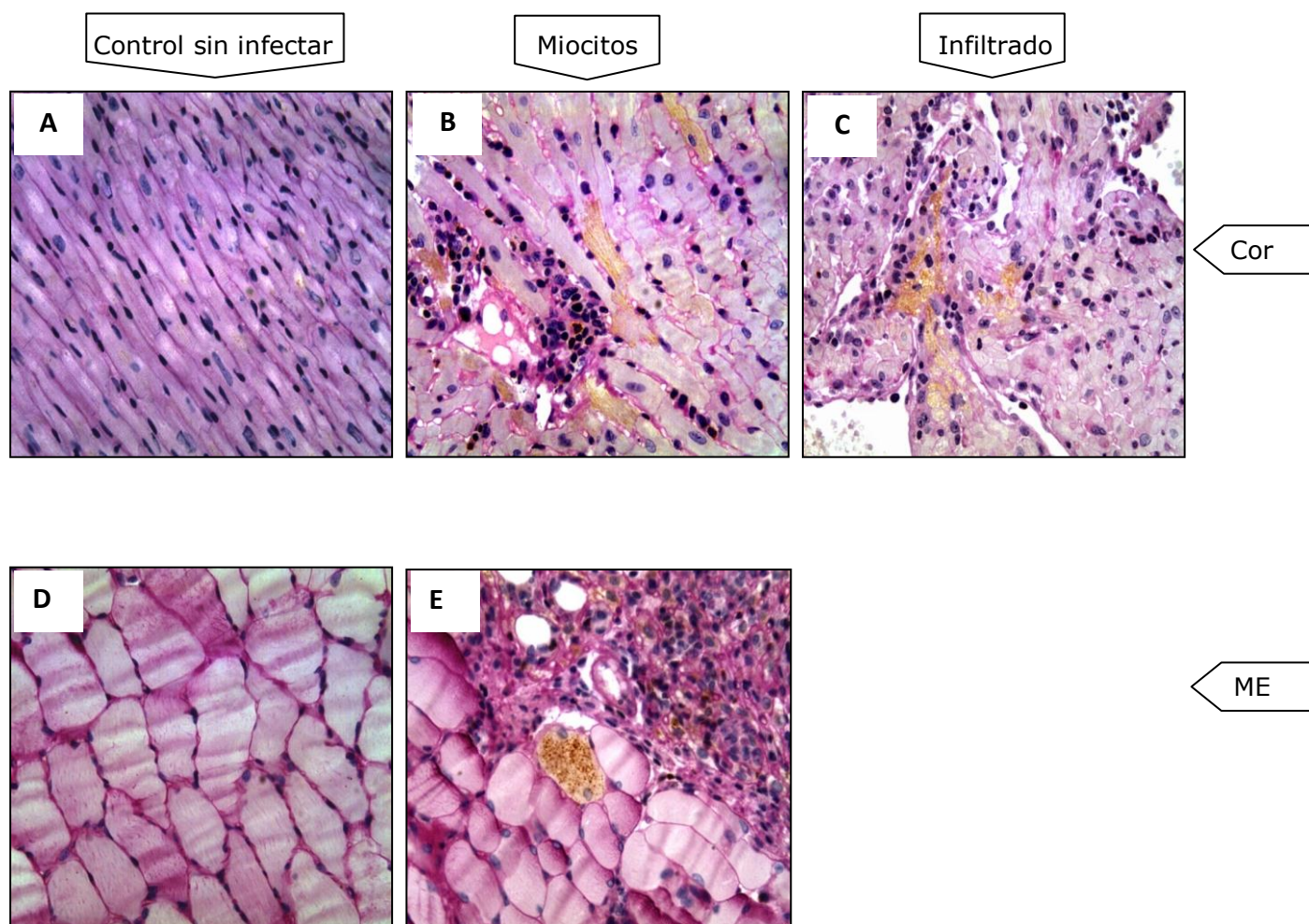


Fig. 20: Expresión muscular de la proteína de CCL5 en la etapa aguda de la infección experimental. El corazón – Cor- (A-C) y el músculo esquelético –ME- (D y E) fueron obtenidos de los animales del ensayo de las Figs. 17 a 19. Muestras de los tejidos fueron incluidas en parafina y estudiadas por inmunohistoquímica para la expresión de la proteína CCL5. Se observó una marcada inducción tanto en los miocitos (B y E, corazón y ME, respectivamente) como en las células infiltrantes (C). No se detectó expresión de CCL5 en las muestras de tejido cardíaco (A) ni en el ME (D) de ratones sin infectar. Las microfotografías son representativas de 3 experimentos independientes. Aumento de todas las microfotografías: 40X.

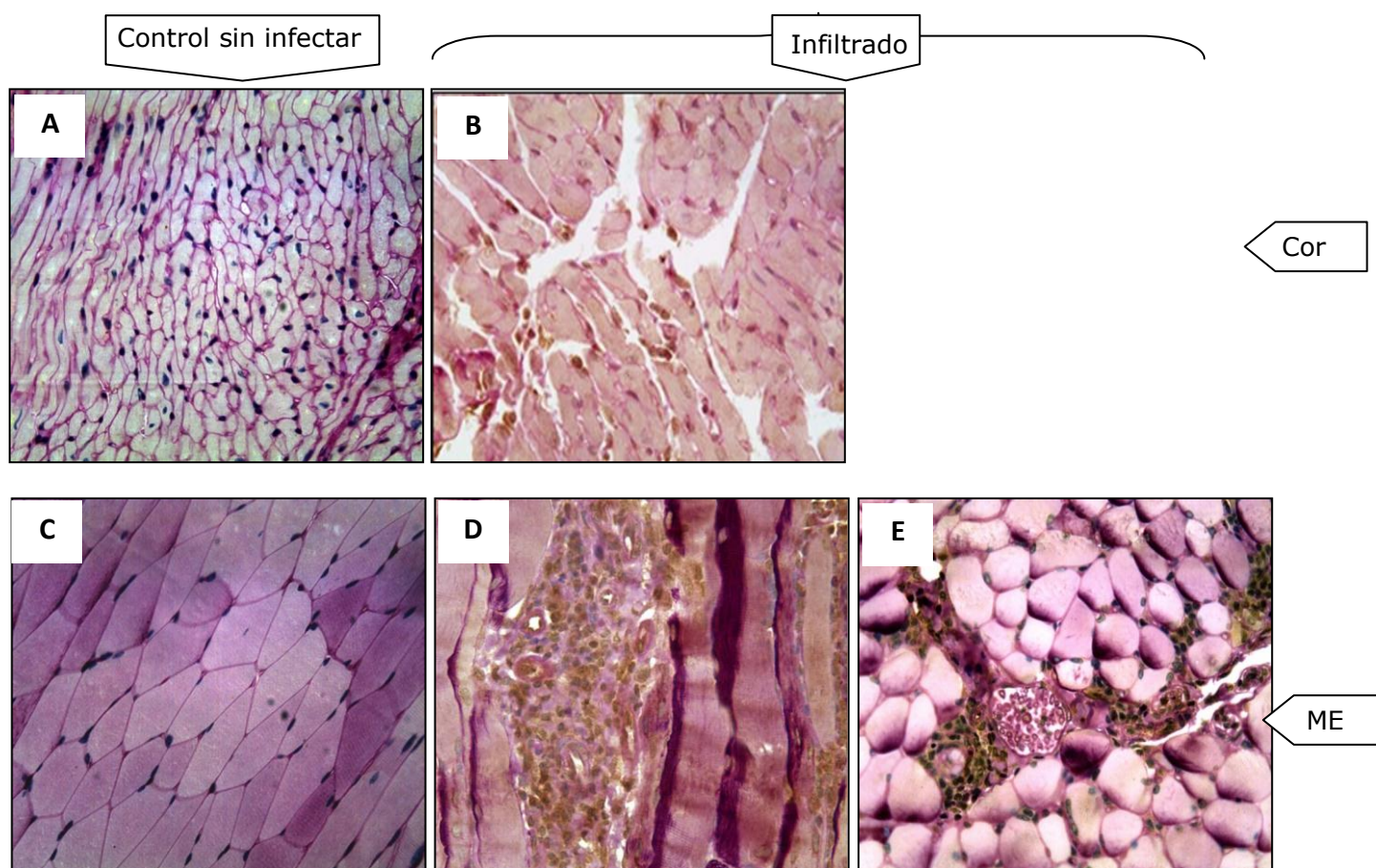


Fig. 21: Expresión muscular de la proteína de CCR5 en la etapa aguda de la infección experimental. El corazón (A y B) y el músculo esquelético –ME– (C-E) fueron obtenidos de los animales del ensayo de las Figs. 17 a 19. Muestras de los tejidos fueron incluidas en parafina y estudiadas por IHQ para la expresión de la proteína CCR5. Se observó una intensa inducción en los linfocitos infiltrantes en ambos tejidos (B, D y E). No se detectó expresión de CCR5 en las muestras de tejido cardíaco (A) ni en el ME (C) de ratones sin infectar. Las microfotografías son representativas de 3 experimentos independientes. Aumento de todas las microfotografías: 40X.

En la etapa crónica, se identificó un perfil más restringido de expresión del ARNm de los mediadores en estudio (Figs. 22, 23 y 24). En algunos casos, como en los de IFN- γ y CCL5, se registraron incrementos en los músculos infectados con respecto a los controles sin infectar, pero carentes de validez estadística (Figs. 22 A-B y 23 A-B, respectivamente). Sin embargo, en esta misma fase de la infección por *T. cruzi* se registró una inducción significativa ($P < 0,05$) de transcriptos de CXCL9 y su receptor CXCR3 en miocardio (Figs. 23 D y 24 D, respectivamente), y de CCR5 en músculo esquelético y corazón (Fig. 24 A y B, respectivamente).

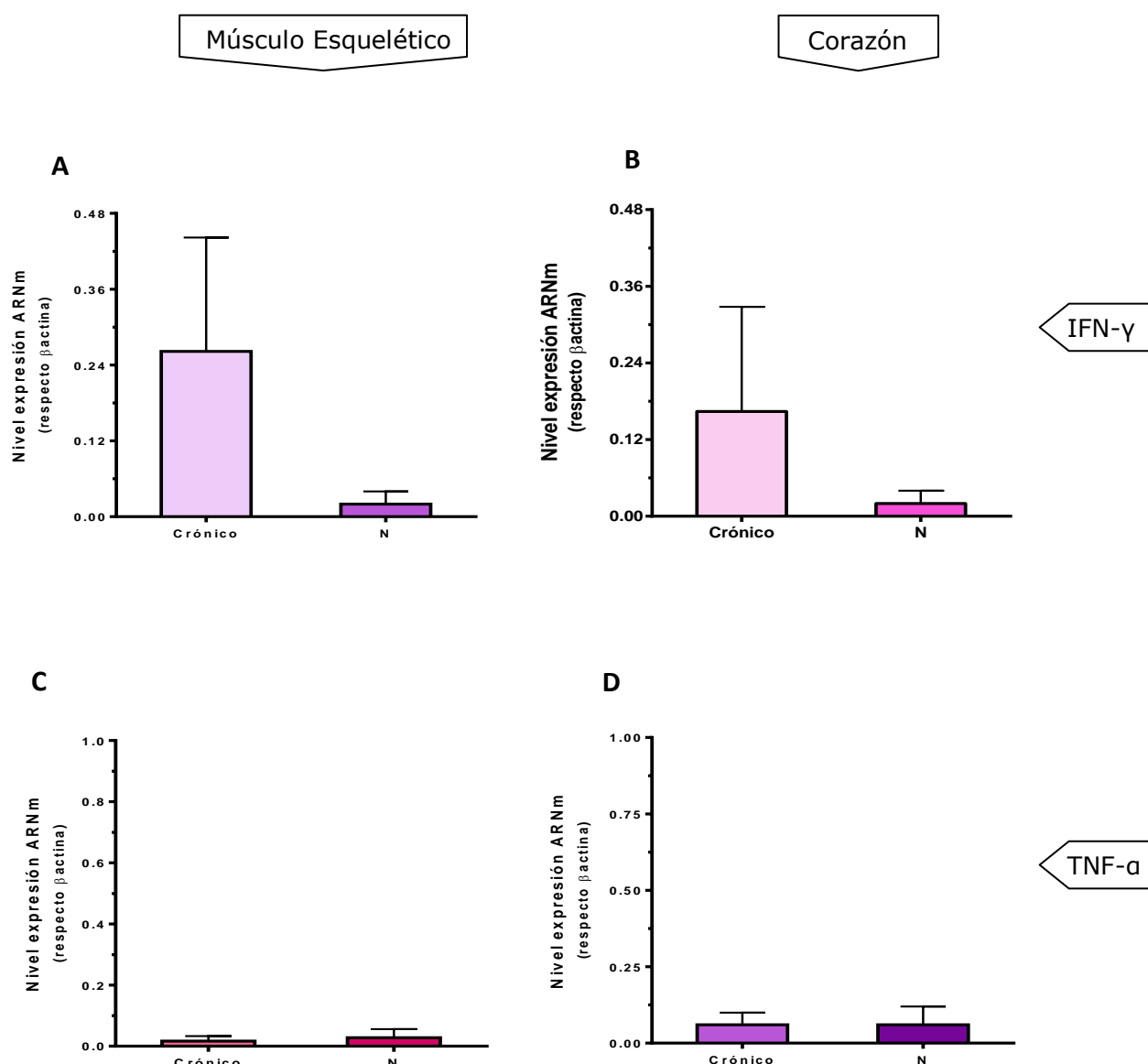


Fig. 22: Expresión muscular de citoquinas proinflamatorias en la etapa crónica de la infección experimental. Los animales fueron infectados con la cepa Sylvio de *T. cruzi* y sacrificados a los 120 dpi. El músculo esquelético y el corazón fueron extraídos y en ellos se estudió la expresión del ARNm de las CQ proinflamatorias IFN- γ (A y B) y TNF- α (C y D). Los transcritos fueron analizados electroforéticamente. El análisis semi-cuantitativo de la expresión de los ARNm corresponde a los resultados de RT-PCR. El nivel de expresión es presentado como el valor medio \pm ESM. Crónico: grupo infectado; N: control sin infección.

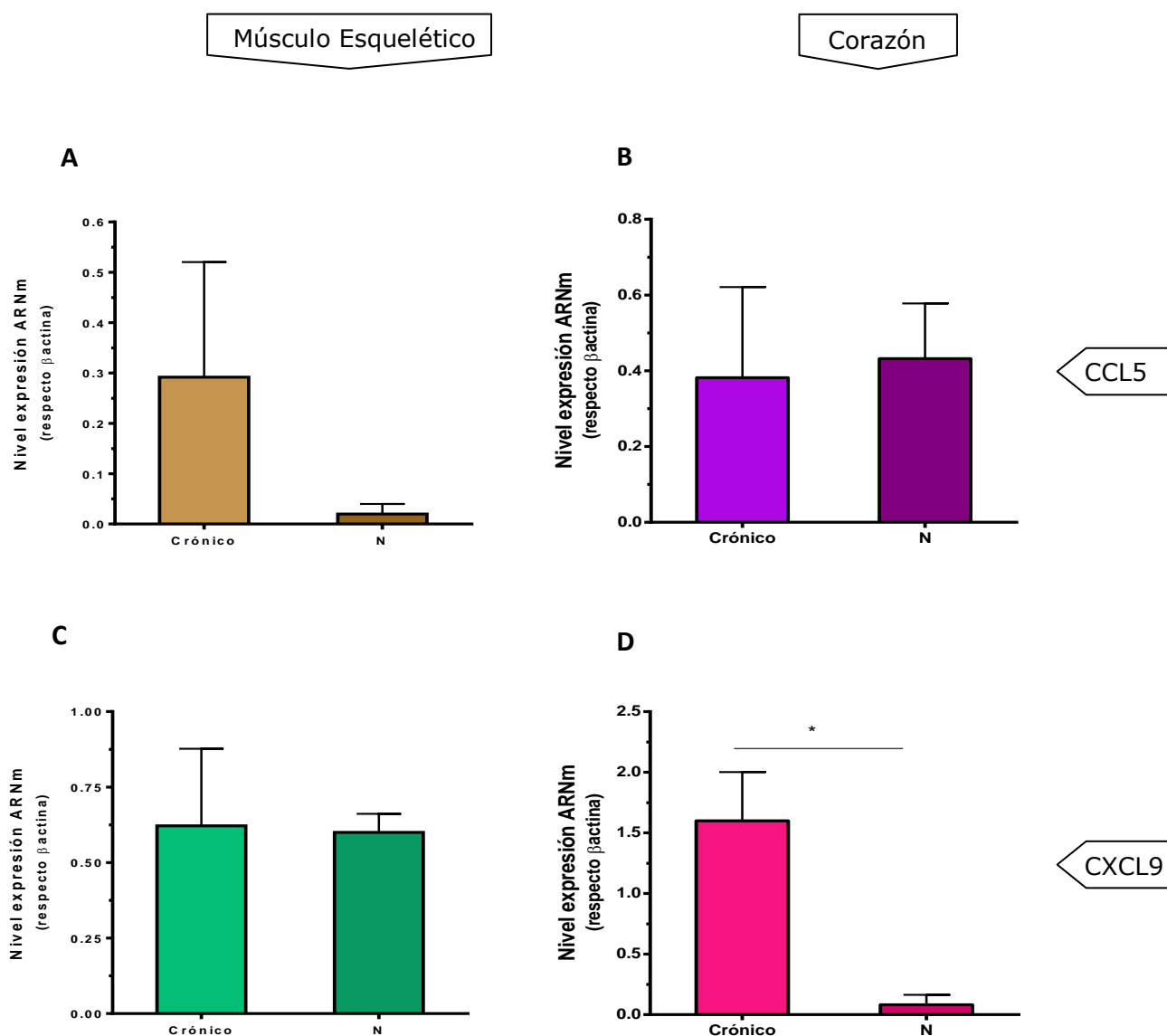


Fig. 23: Expresión muscular de quimioquinas proinflamatorias en la etapa crónica de la infección experimental. Los animales fueron infectados y sacrificados como se mencionó en la figura anterior. Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de CCL5 (**A** y **B**) y CXCL9 (**C** y **D**) en músculo esquelético y corazón. Los gráficos indican el valor medio \pm ESM. * $P < 0,05$; diferencias entre los grupos de animales infectados y control.

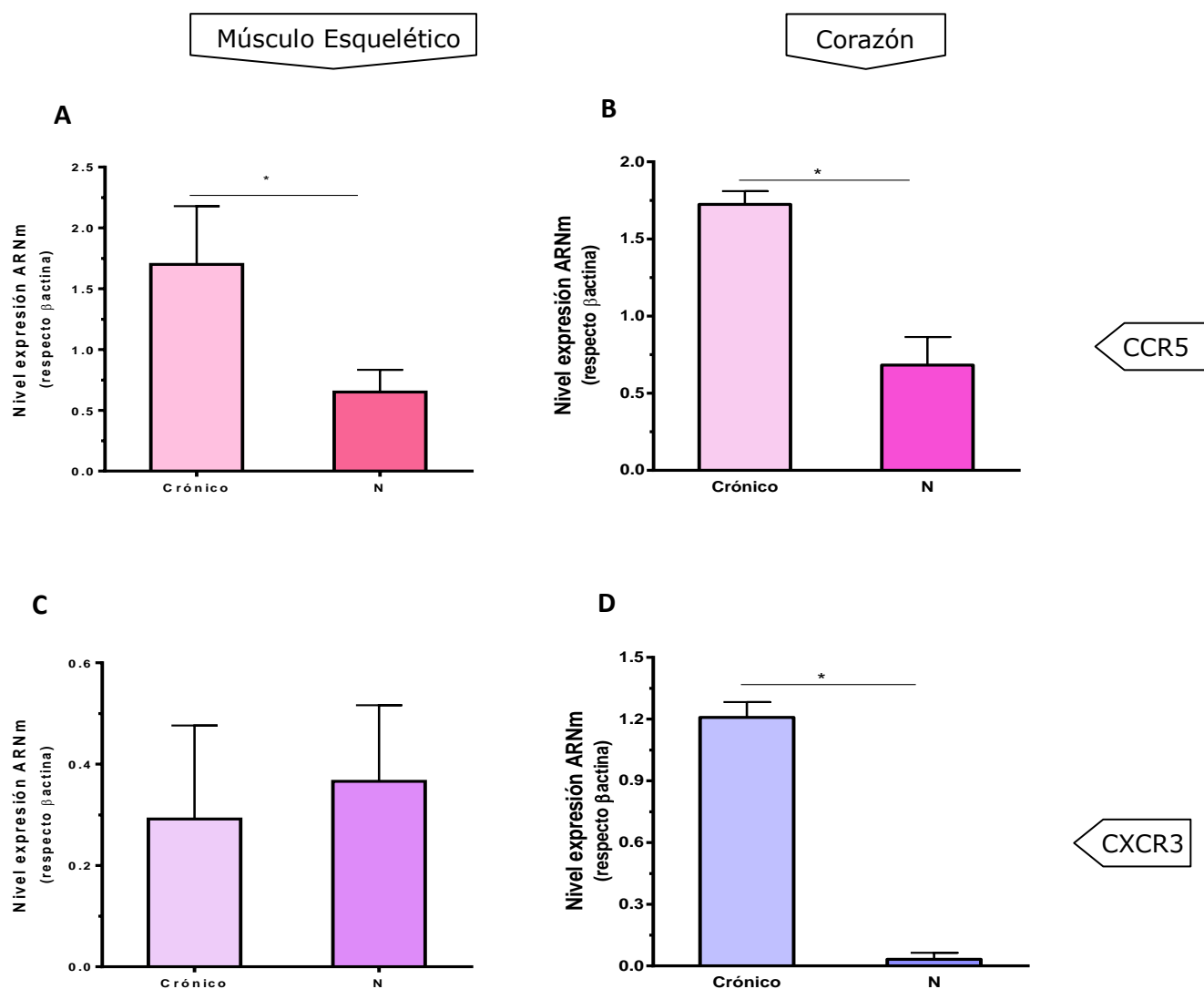


Fig. 24: Expresión muscular de receptores de quimioquinas proinflamatorias en la etapa crónica de la infección experimental. Los animales fueron infectados y sacrificados como se mencionó en la figura 22. Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de CCR5 (**A** y **B**) y CXCR3 (**C** y **D**) en músculo esquelético y corazón. Los gráficos indican el valor medio \pm ESM. * $P < 0,05$; diferencias entre los grupos de animales infectados y control.

3.2 Caracterización fenotípica de las CMSP y del infiltrado inflamatorio de tejido cardíaco en ratones con infección crónica

Con el objetivo de vincular la mencionada expresión del ARNm para CXCL9 y su receptor inducida por *T. cruzi* en el tejido cardíaco con los mecanismos de reclutamiento de leucocitos hacia el miocardio infectado, se investigó la presencia de la proteína CXCR3 en la superficie de células del infiltrado inflamatorio y mononucleares de sangre periférica, con foco en la subpoblación de linfocitos T. Se observó un fuerte aumento ($P=0,004$) de la frecuencia de CMSP que expresan CXCR3 en ratones crónicamente infectados, respecto de aquellos sin infección ($21,6 \pm 5,3$ % vs $4,8 \pm 2,0$ % respectivamente) (Tabla IV). La subpoblación $CD8^+$ fue la que mayoritariamente mostró el receptor en superficie ($13,4\%$ vs $1,2\%$ en animales control) (Fig. 24), mientras que el resto de las subpoblaciones estudiadas ($CD4^+$ y $MAC-1/CD11b^+$) exhibieron sólo niveles basales de CXCR3, comparables con los de CMSP provenientes de animales sin infectar. Al estudiar la relación $CD8^+/CD4^+$ en CMSP de ratones infectados, se obtuvo un valor de 3,0, mientras que en los controles fue de 0,6 (Tabla IV).

CMSP		
	N (%)	Infectados (%)
CXCR3⁺	$4,8 \pm 2,0$	$21,6 \pm 5,3$
CD8⁺/CD4⁺	0,6	3

Tabla IV: Expresión del receptor CXCR3 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ratones crónicamente infectados y animales libres de infección (N). Ratones de la cepa C3H fueron infectados con la cepa Sylvio de *T. cruzi* y sacrificados a los 120 dpi. La sangre fue extraída por punción retro-orbital para aislar las CMSP por el método de Hystopaque[®] 1083. Las mismas fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti- CXCR3, CD8 y CD4 y adquiridas en un citómetro de flujo. Los valores se indican como la media \pm ESM del % de células positivas y representan los resultados de dos ensayos independientes.

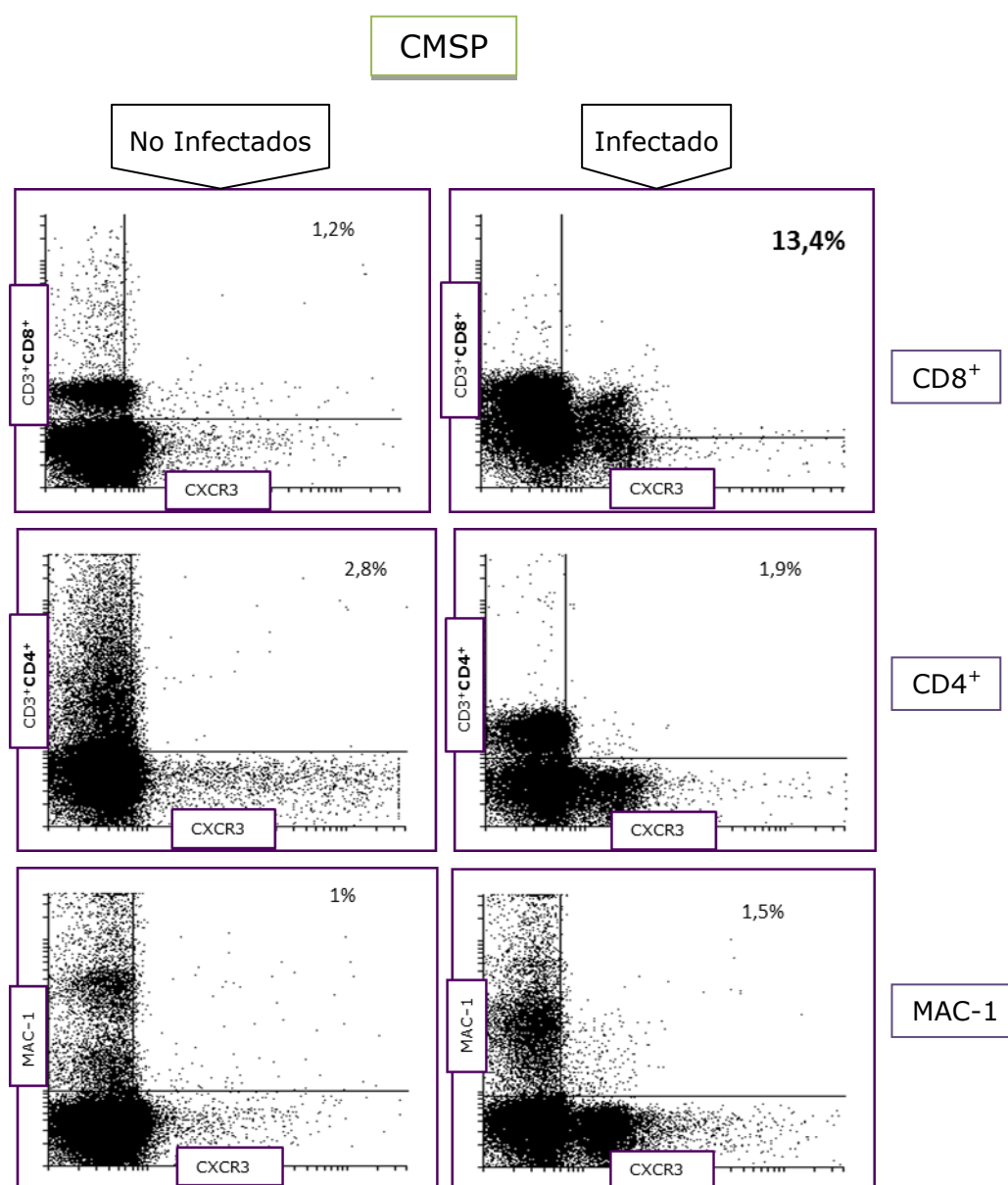


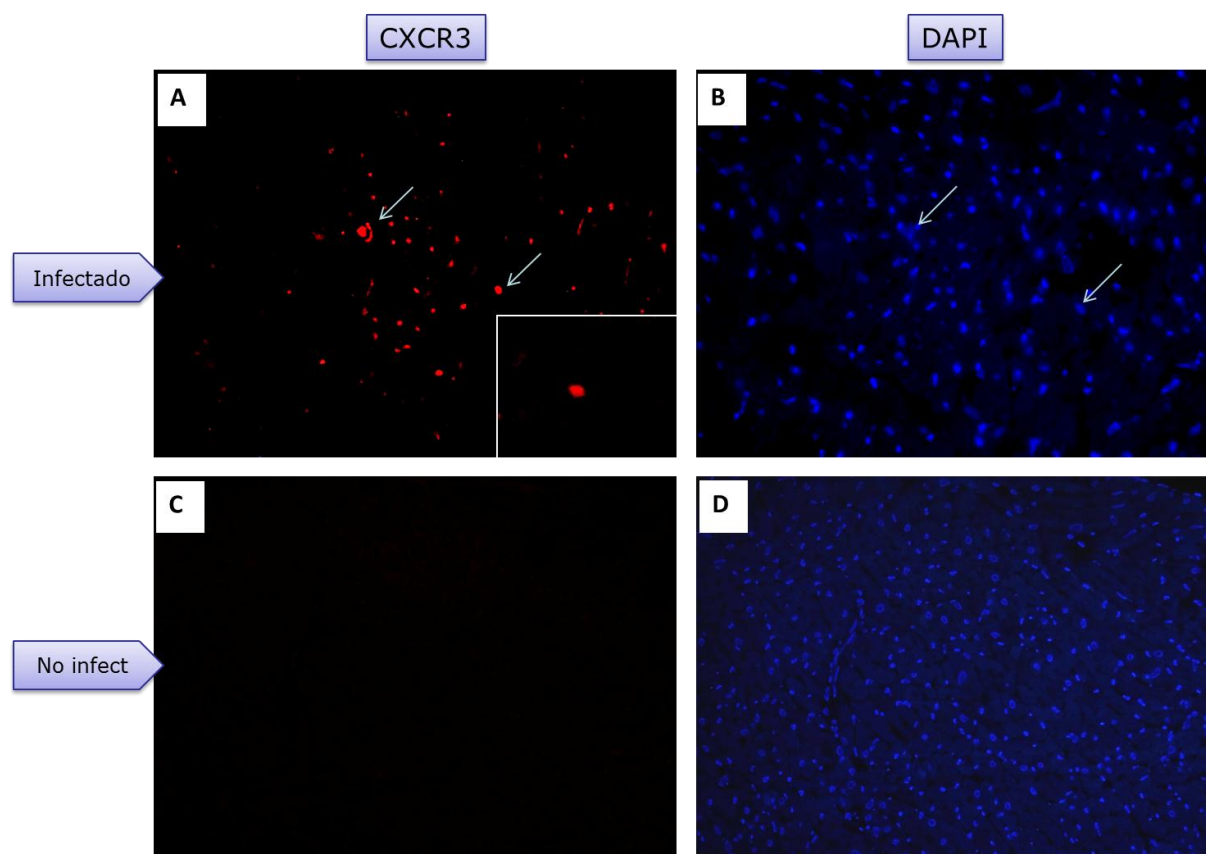
Fig. 24: Expresión del receptor CXCR3 en CMSP de ratones crónicamente infectados y no infectados. Ratones C3H fueron infectados con la cepa Sylvio de *T. cruzi*, sacrificados a los 120 dpi y la sangre extraída fue empleada para aislar las CMSP, como se comentó previamente. Las mismas fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti- CD3, CD4, CD8, MAC-1 y CXCR3 y adquiridas en un citómetro de flujo. Los datos fueron analizados con el programa Cyflogig 1.2.1. Los valores representan los resultados de dos ensayos independientes.

Por otro lado, el análisis del infiltrado inflamatorio aislado del miocardio de ratones crónicamente infectados arrojó una relación CD8⁺/CD4⁺ de 3,7, con un $16,0 \pm 4,2\%$ de células CXCR3⁺ (Tabla V). Dentro del compartimento CD8⁺, $5,0 \pm 1,9\%$ resultó CXCR3⁺, mientras que sólo $1,5 \pm 1,4\%$ de leucocitos CD4⁺ presentaba dicho receptor en su

superficie. Debido a que en el corazón sin infectar no se evidencia ningún infiltrado inflamatorio, se estudió por inmunofluorescencia la expresión de CXCR3 en el tejido cardíaco de ratones no infectados para descartar la eventual presencia de este receptor en superficie. Las muestras de corazón de ratones sin infectar no presentaron marca específica, mientras que en miocardio de animales con infección crónica por *T. cruzi* se observó reactividad en los linfocitos infiltrantes (Microfotografía 5), coincidiendo con lo hallado previamente en el infiltrado aislado.

Infiltrado Inflamatorio (%)	
CXCR3 ⁺	16,0 ± 4,2
CD8 ⁺ ,CXCR3 ⁺	5,0 ± 1,9
CD4 ⁺ ,CXCR3 ⁺	1,5 ± 1,4

Tabla V: Expresión del receptor CXCR3 en células del infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco de ratones crónicamente infectados. Las muestras de corazón obtenidas de los ratones del ensayo anterior fueron procesadas para la extracción de los leucocitos infiltrantes. El tejido cardíaco fue digerido con collagenasa y hialuronidasa, y el sobrenadante de la digestión fue reservado para el aislamiento de las células del infiltrado mediante Hystopaque® 1083. Los leucocitos fueron marcados con anticuerpos monoclonales anti- CXCR3, CD8 y CD4 y adquiridos en un citómetro de flujo. Los datos fueron analizados por el programa Cyflogic 1.2.1 y expresan el % de células positivas para cada marcador. Los valores se indican como la media ± ESM y representan los resultados de dos ensayos independientes.



Microfotografía 5: Expresión del receptor CXCR3 en el miocardio de ratones crónicamente infectados. Muestras de tejido cardíaco del ensayo del ítem 3.2 fueron incluidas en parafina y empleadas para detectar la expresión de CXCR3 en la superficie de los leucocitos infiltrantes. Las flechas señalan tinción específica en las células del infiltrado inflamatorio de los animales infectados, visualizadas mediante microscopía de fluorescencia con el filtro adecuado (40X). Nótese la ausencia de marca en la muestra de tejido no infectado (C). Tinción nuclear DAPI (B y D).

4. Efecto inmunomodulador del benznidazol administrado en la etapa crónica de la infección chagásica

4.1. Expresión de MIF y parámetros histopatológicos en corazón y músculo esquelético luego de administrar BZ a ratones con infección prolongada

Como primera aproximación se evaluó la expresión del ARNm de MIF en corazón y músculo esquelético de ratones infectados con *T. cruzi* a los que se les administró BZ durante la fase crónica tardía. Las muestras de tejido cardíaco de animales infectados que no recibieron tratamiento expresaron mayores niveles de MIF que los ratones

infectados tratados con BZ, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$). Los valores determinados en este último grupo fueron similares a los detectados en los ratones sin infectar, tratados o no con BZ (Fig. 25A). Para corroborar los hallazgos resultantes del análisis de ARNm, se estudió la expresión de la proteína MIF en el tejido cardíaco de ratones que recibieron tratamiento parasitocida en la etapa crónica, comparándola con la que presentaban los animales infectados no tratados con BZ. En las muestras del primer grupo se observó menor intensidad en la marca específica de MIF que la detectada en miocardio de ratones infectados a los que no se les administró la droga antichagásica (Microfotografía 6, A y B). A diferencia de lo que ocurre en corazón, los niveles de MIF en el músculo esquelético de los animales infectados, tratados o no con BZ, fueron semejantes a los de las muestras de controles sin infectar (Fig. 25B). Se demostró también que el BZ por sí solo no es capaz de alterar la expresión de MIF en los tejidos en estudio.

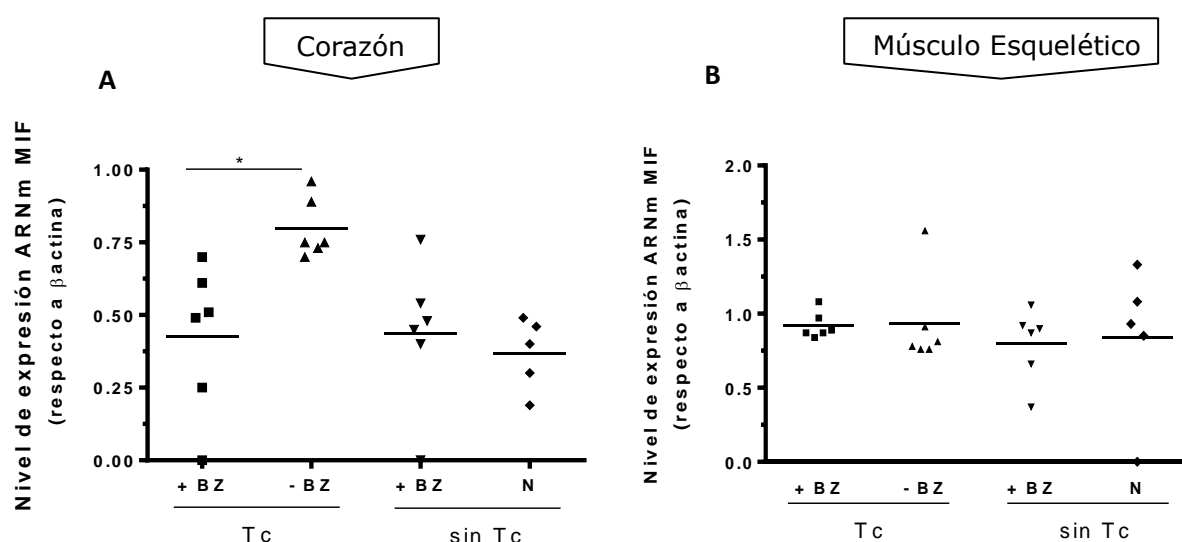
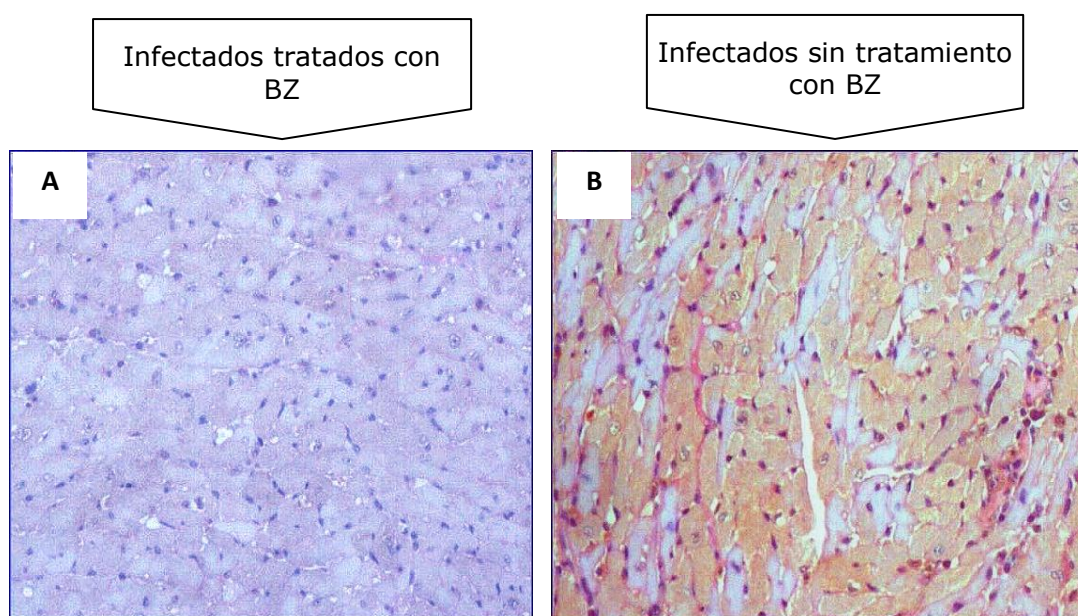


Fig. 25: Efecto del tratamiento con BZ, administrado en etapa crónica, sobre la expresión del ARNm de MIF. Ratones C3H fueron infectados con la cepa Tulahuén del parásito (Tc); a los 90 dpi fueron tratados con 100 mg/kg de BZ durante 30 días y sacrificados a los 60 días luego de finalizado el tratamiento parasitocida. Se extrajeron los órganos para estudiar la expresión del ARNm de MIF, de idéntica forma a lo mencionado en la Fig. 17. Niveles de la CQ en tejido cardíaco (A) y músculo esquelético (B) de ratones crónicamente infectados y tratados o no con BZ en esta etapa de la enfermedad. * $P < 0,05$; ratones infectados y tratados con BZ vs animales infectados que no recibieron tratamiento con la droga. N: control sin infección.



Microfotografía 6: Efecto del tratamiento con BZ, administrado en etapa crónica, sobre la expresión de MIF. Muestras de tejido cardíaco de los animales del ensayo anterior fueron evaluadas para la expresión de MIF por inmunohistoquímica. Las muestras de animales infectados y tratados con la droga parasitocida mostraron una menor expresión de MIF (**A**), mientras que los ratones infectados sin tratar evidenciaron una intensa inducción de la CQ (**B**). Las fotos son representativas de 3 ensayos independientes. Aumento de ambas microfotografías: 40X.

Paralelamente, se evaluaron los parámetros histopatológicos en las muestras de corazón de los distintos grupos experimentales. En paralelo con la disminución observada en la expresión de MIF en el tejido cardíaco, se observó una reducción significativa ($P < 0,05$) en el índice inflamatorio de las muestras de ratones infectados y tratados con BZ respecto de aquellos infectados sin tratar (Fig. 26). En aquellos animales no inoculados con el parásito no se halló infiltrado inflamatorio alguno.

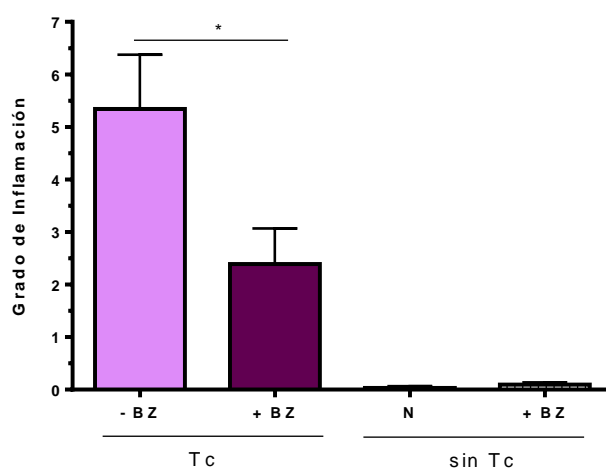
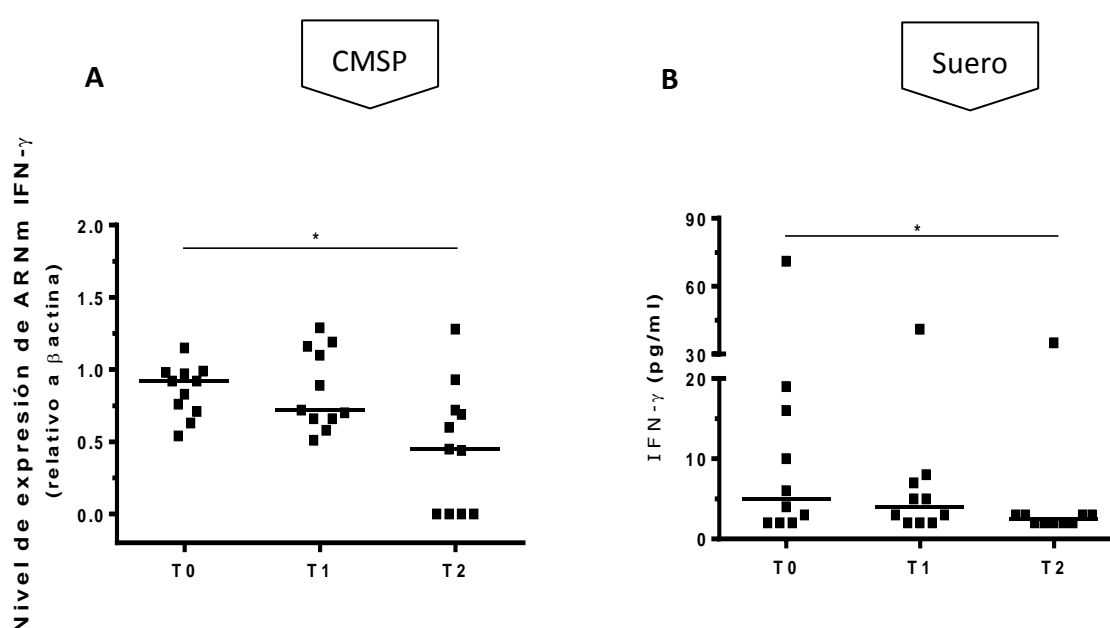


Fig. 26 (página anterior): Grado de inflamación de tejido cardíaco de ratones infectados y tratados con BZ en la etapa crónica de la enfermedad. Las muestras de corazón del ensayo anterior fueron observadas al microscopio óptico con el fin de evaluar la intensidad y la extensión del infiltrado inflamatorio tisular. Los valores se indican como la media \pm ESM y representan los resultados de dos ensayos independientes. * $P < 0,05$.

4.2. Expresión de mediadores inflamatorios en CMSP y suero de pacientes cursando la etapa crónica temprana de la infección luego del tratamiento parasiticida

Se estudió la expresión de CQ proinflamatorias como IFN- γ y MIF (ARNm en CMSP y proteína circulante en suero) en pacientes pediátricos, antes y después del tratamiento parasiticida con BZ (Fig. 27A-D). Los niveles de ARNm para ambos mediadores se redujeron significativamente ($P < 0,05$) 6 meses luego de finalizada la terapia contra *T. cruzi* (T0 vs T2) (Fig. 27, A y C). En coincidencia con dicha observación, la concentración sérica de cada una de las CQ evaluadas mostró una significativa tendencia decreciente de MIF ($23,9 \pm 5,2$ ng/ml a T0 vs $19,0 \pm 3,7$ ng/ml a T2, $P < 0,05$) y un descenso efectivo de IFN- γ ($13,5 \pm 6,7$ pg/ml a T0 vs $5,7 \pm 3,2$ pg/ml a T2, $P < 0,05$) a lo largo del seguimiento, reflejando una caída de 20,8 % y 57,8 % de los niveles iniciales de MIF e IFN- γ , respectivamente. En cambio, no se hallaron diferencias estadísticamente válidas entre las muestras del inicio y las inmediatas al fin del tratamiento (T0 vs T1) para la expresión de transcritos y proteínas circulantes de los mediadores inflamatorios analizados.



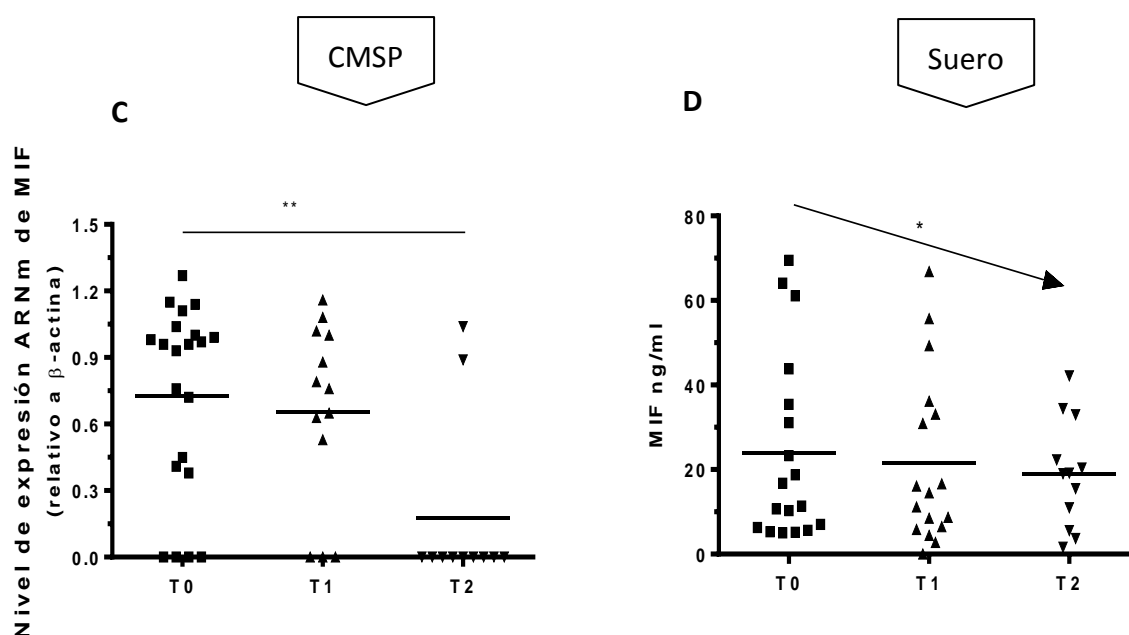


Fig. 27: Expresión de IFN- γ y MIF en pacientes pediátricos antes y después del tratamiento con BZ. Las muestras de sangre de pacientes pediátricos (edad \bar{X} : 12 años) cursando la etapa crónica indeterminada de la enfermedad fueron obtenidas para el estudio de la expresión del ARNm (en CMSP) y la proteína (en suero) de IFN- γ (**A** y **B**) y MIF (**C** y **D**). Las muestras se recolectaron a distintos tiempos: T0: antes del tratamiento; T1: al finalizar el mismo; T2: 6 meses luego de finalizado el tratamiento parasiticida. Los resultados se expresan como el valor medio. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Papel de MIF en los mecanismos de respuesta inflamatoria generados en la etapa temprana de la infección por *T. cruzi*

Los macrófagos desempeñan un papel importante durante la infección por *T. cruzi*, actuando tanto como célula hospedadora así como en su función efectora contra el parásito. Nuestro estudio muestra que, entre otros múltiples factores, la CQ proinflamatoria MIF es capaz de activar la maquinaria microbiostática/microbicida del macrófago que logra restringir la multiplicación de las formas intracelulares del *T. cruzi*. Es sabido que MIF tiene una participación crítica en la defensa del hospedador contra la infección chagásica aguda. Se demostró que ratones genéticamente deficientes en MIF resultan altamente susceptibles al *T. cruzi*, desarrollando elevados niveles de parasitemia y parasitismo tisular, asociados a una severa miocardiopatía y alta tasa de mortalidad¹⁸⁴. Por otra parte, en la infección por *Leishmania donovani* el papel protector de MIF ha sido atribuido a su capacidad para inducir la actividad microbicida de macrófagos²⁵¹. Nuestros datos de infección *in vitro* de macrófagos J774 con *T. cruzi* evidencian que el tratamiento con MIF exógeno lleva, de un modo dependiente de la dosis y el período de estimulación, a una disminución de la carga parasitaria intracelular, en comparación con la hallada en los controles infectados sin tratar. Eventualmente, las acciones autócrinas y parácrinas del MIF secretado por los fagocitos infectados podrían potenciar aún más la actividad tripanocida, en vista de que nuestros hallazgos demuestran que el *T. cruzi* posee la capacidad de gatillar la liberación de esta CQ al invadir macrófagos murinos. Por el contrario, no se encontraron evidencias de actividad anti-*T. cruzi* dependiente de MIF en células no inmunes como los miocitos cardíacos. La razón de esta respuesta diferencial según el tipo celular analizado no surge con claridad, pero podría relacionarse con la reportada inducción de señales en miocardio mediadas por MIF y CD74 acoplado a la proteína quinasa activada por AMP, una cascada antiinflamatoria que conduce a la inhibición de la vía del factor de transcripción NFκB, con la consecuente reducción en la producción de ERO y TNF-α²⁵²⁻²⁵⁴. Verificamos también que en las células J774 la estimulación con MIF exógeno hace más efectiva la activación de mecanismos parasiticidas desencadenada por IFN-γ. Es bien conocido que al activar los macrófagos con IFN-γ, se produce una potente inducción del eje iNOS/NO que facilita el control de la proliferación del *T. cruzi*²⁵⁵. La cooperación sinérgica observada entre IFN-γ y MIF dio

como resultado una caída significativa del número de fagocitos infectados y parásitos intracelulares, marcadamente por debajo del valor registrado en las muestras tratadas solamente con IFN- γ . Estos hallazgos concuerdan con trabajos previos que demuestran que la combinación con otras CQ refuerza la capacidad del IFN- γ para restringir el crecimiento del *T. cruzi* en macrófagos^{256,257}.

Los principales mecanismos efectores involucrados en la resistencia contra la infección por *T. cruzi* son dependientes en mayor o menor medida de la activación de los macrófagos. En nuestro modelo *in vitro*, MIF contribuyó a la eliminación del parásito en las células J774, al inducir una mayor producción endógena de ERO, TNF- α y, en menor grado, NO. La capacidad de MIF para promover *per se* la síntesis y liberación de estos mediadores inflamatorios ya ha sido demostrada^{182,258,259}. Más importante aún, se ha reportado que MIF induce la actividad leishmanicida de los fagocitos a través de un proceso dependiente de NO y TNF- α ²⁶⁰. De manera similar, nuestros resultados indican que tanto ERO, como TNF- α y NO cumplen un papel fundamental en los mecanismos anti-*T. cruzi* disparados por MIF en macrófagos. Cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre con IFN- γ que promueve primariamente la formación de intermediarios del nitrógeno, MIF gatilla mecanismos microbicidas dependientes principalmente del O₂. En nuestra experiencia, MIF fue capaz de inducir ERO a tiempos muy breves de estimulación, lo que sugiere que la pronta generación de radicales del O₂, característicos del estallido respiratorio, sería esencial para la eliminación temprana de las formas intracelulares del parásito. En línea con estos hallazgos, otros autores informaron que macrófagos deficientes en MIF fueron incapaces de controlar la infección por *Mycobacteria* concomitantemente con una reducida producción de ERO, aún cuando mantenían preservada la formación de NO²⁶¹. Sumado a la generación de ERO y NO, TNF- α demostró ser otra molécula efectora clave involucrada en la actividad tripanostática/tripanocida de células J774 bajo estímulo de MIF. El TNF- α secretado por los macrófagos juega un rol decisivo en la respuesta inmune contra *T. cruzi* mediante la inducción indirecta del eje iNOS/NO. Además, TNF- α actúa en forma autócrina y parácrina sobre la activación de fagocitos, potenciando las acciones mediadas por IFN- γ e incrementando su propia síntesis y la de otras CQ²⁶². Nuestras observaciones indican que el tratamiento prolongado con MIF exógeno promueve una elevada producción de TNF- α en las células J774 infectadas, contribuyendo así a un mayor control de la proliferación del parásito. En comparación con la activación de macrófagos por IFN- γ , MIF resultó ser un mejor inductor de TNF- α

y ERO, pero algo menos eficiente para estimular la liberación de NO en estas células. En resumen, nuestros resultados señalan que MIF es capaz de activar macrófagos por la vía clásica, lo que facilita la eliminación de formas intracelulares del *T. cruzi* mediante mecanismos parasitocidas en los que participan ERO, TNF- α y NO.

La inducción de la expresión muscular de MIF, observada desde el inicio (7 dpi) y sostenida a lo largo de la fase parasitémica de la infección chagásica experimental, coincide con el protagonismo atribuido a esta CQ en la resistencia temprana contra *T. cruzi*¹⁸³. El incremento de MIF anticipó la inducción de otras CQ proinflamatorias, lo cual sugiere que en los músculos examinados estaría ubicado por encima de TNF- α e IFN- γ en la cascada de activación disparada por la infección parasitaria. El análisis de tejidos musculares claves (miocardio y músculo esquelético) afectados por la infección aguda reveló por primera vez la presencia de MIF en áreas de inflamación existentes en los mismos, localizada tanto en los miocitos como en los leucocitos infiltrantes. Estudios previos han descrito la expresión aumentada de MIF en fibras musculares en respuesta a diferentes estímulos^{263,264}. Es factible que la liberación de este mediador proinflamatorio por células musculares, linfocitos T y macrófagos tisulares desde el comienzo de la infección constituya una forma precoz de controlar la invasión y multiplicación del parásito en corazón y músculo estriado a través de alguno/s de los mecanismos parasitocidas detallados anteriormente.

Más allá de su función defensiva, encontramos que la producción local exacerbada de MIF también puede asociarse con un estado de inflamación muscular y rhabdomiólisis existente durante la etapa inicial de la infección en ratones. Los miocitos se involucran activamente en el reclutamiento de células mononucleares desde el torrente sanguíneo hacia corazón y músculo esquelético, y establecen diversas interacciones con los leucocitos infiltrantes. A partir de esa conjunción se induce la síntesis y liberación de múltiples CQ y QQ, lo cual contribuye a crear condiciones para la inflamación persistente²⁶⁵. Muchos de estos mediadores musculares resultan determinantes para contener la infección; sin embargo, el parásito es capaz de desregular la respuesta protectora del hospedador, impulsando la patología inflamatoria tisular²⁰⁶. Así, desde los primeros momentos en el curso de la infección comienza un proceso proinflamatorio que, dependiendo de su magnitud, puede contribuir significativamente al establecimiento del infiltrado leucocitario en tejido cardíaco presente durante la etapa crónica sintomática²⁶⁶. En nuestro modelo murino

de infección aguda encontramos, acompañando el incremento en los niveles de MIF, un aumento de CQ y QQ proinflamatorias y sus receptores, con ligeras variaciones en su cinética de expresión en corazón y músculo estriado. Se detectó una inducción progresiva de TNF- α , IFN- γ , CCL5/CCR5 y CXCL9/CXCR3, en paralelo con la severidad de la carga parasitaria y de la miopatía inflamatoria. Las QQ inducidas principalmente por IFN- γ , así como sus receptores, cumplen un rol destacado en el control de la infección reciente, aunque también han sido relacionadas con la injuria inflamatoria muscular^{86,265}. Un análisis detallado de los focos de inflamación aguda en distintos músculos de ratones infectados nos permitió distinguir los tipos celulares que expresaban algunos de estos mediadores. Particularmente, encontramos una alta expresión de CCL5/CCR5 tanto en las miofibras como en los leucocitos que migraban al tejido muscular cardíaco y esquelético, excepto en el caso de CCR5 en corazón cuya localización estaba restringida fundamentalmente al infiltrado inflamatorio. En coincidencia con esta observación, estudios previos han identificado una fracción importante de células T CD8⁺ con este receptor de QQ en su superficie, localizadas en las lesiones inflamatorias de miocardio provocadas por la infección con *T. cruzi*²²⁸.

En lo relativo a la infección humana temprana, hemos encontrado niveles séricos elevados de MIF en un grupo de niños en sus primeros meses de vida, infectados por vía congénita. Al igual que en el modelo murino, esta producción incrementada de MIF forma parte de la respuesta inmune madura contra el parásito que presenta el neonato y podría asociarse con un mecanismo defensivo precoz. Son escasos los estudios acerca del perfil de CQ inducido en pacientes pediátricos con infección reciente por *T. cruzi*. En niños con Chagas agudo, Samudio y col.²⁶⁷ encontraron una expresión aumentada de ARNm para IFN- γ , IL-2 e IL-10 en CMSP, mientras que Moretti y col.²⁶⁸ detectaron un aumento, aunque sin validez estadística, de los niveles circulantes de TNF- α e IL-6, junto con un incremento significativo del receptor soluble para IL-2 en suero. Además, en neonatos con infección congénita por *T. cruzi* se ha reportado una concentración sérica de TNF- α inferior a la determinada en recién nacidos no infectados y una tendencia a polarizar la repuesta inmune hacia el patrón proinflamatorio, con producción de IFN- γ ^{269,270}. Nuestras observaciones constituyen el primer reporte acerca de la inducción de MIF durante la fase inicial de la infección humana por *T. cruzi*, en forma análoga a lo que ocurre en otras patologías infecciosas²⁷¹⁻²⁷³.

Papel de MIF en los mecanismos de respuesta inflamatoria generados a lo largo de la etapa crónica de la infección con *T. cruzi*

Como se ha señalado anteriormente, la expresión de mediadores inflamatorios en la etapa aguda es necesaria para el control de la infección parasitaria. Sin embargo, su inducción sostenida, finalizada esta etapa, puede resultar patogénica. La persistencia del parásito en el hospedador abre la posibilidad de alterar los procesos que regulan la respuesta defensiva original. Así, al progresar el período crónico, la ocurrencia de un desbalance entre la inmunidad que contiene el avance del parásito y la reacción inflamatoria capaz de provocar daño tisular puede determinar el curso agravado de la infección chagásica.

MIF es considerado un mediador crítico en la inmunidad precoz frente a distintas infecciones por protozoos parásitos¹⁸³. Como ya se ha observado para otras CQ que juegan un rol dual durante el curso de la infección¹⁸⁶, la inducción de MIF también aparece asociada a la fisiopatología de enfermedades parasitarias en humanos, tales como malaria cerebral y leishmaniasis visceral^{188,190}. En nuestro estudio, desde el inicio de la etapa indeterminada hallamos valores aumentados de ARNm y proteína de MIF en CMSP y suero, respectivamente, de pacientes pediátricos seropositivos para *T. cruzi*. Esta población también presentó otra CQ proinflamatoria emblemática como IFN- γ y en niveles incrementados, los que han sido asociados tanto con el éxito terapéutico frente a la infección reciente, como con un peor pronóstico en pacientes chagásicos crónicos²⁷⁴. Esta aparente paradoja pone de manifiesto la importancia de la diferencia temporal en la expresión de los factores proinflamatorios, fundamentales para la resistencia en la etapa aguda pero que a largo plazo pueden ser perjudiciales para el hospedador. Nuestro grupo de pacientes con infección prolongada y miocardiopatía severa por *T. cruzi* también presentó alto nivel de MIF en suero, significativamente superior al hallado en los pacientes adultos con Chagas crónico sin patología cardíaca evidente. En este caso, nuevamente se vuelve relevante la temporalidad de la expresión de MIF. En los primeros estadios de la etapa indeterminada, los elevados niveles de esta CQ podrían ser consecuencia del proceso inflamatorio generado precozmente en respuesta a la infección y que resulta esencial para la resistencia frente al parásito. En la etapa crónica asintomática, en cambio, especulamos que la limitada inducción de este factor reflejaría un compromiso leve o prácticamente inexistente de la función cardíaca. Esta forma indeterminada probablemente esté

relacionada con una respuesta inmune específica más eficiente y mejor regulada, que resulta en una reducida carga parasitaria, bajo grado de inflamación en miocardio y ausencia de anomalías en la microvasculatura, por lo cual las complicaciones clínicas difícilmente puedan ponerse en evidencia. A diferencia de ello, en los pacientes sintomáticos con patología inflamatoria severa consideramos válido plantear una asociación entre los valores incrementados de MIF y la gravedad de la miocardiopatía observada. Apoyando esta hipótesis, hallamos correlaciones significativas entre la concentración de esta CQ en circulación y parámetros ecocardiográficos representativos de daño cardíaco característicos de la enfermedad de Chagas, como el aumento de los diámetros DVI, DVD, AI y de aorta¹⁸. La correlación positiva con los valores séricos de PCR-AS, otro indicador vinculado con patología inflamatoria chagásica²⁷⁵, permite proponer a MIF como candidato a ser evaluado en la búsqueda por definir un perfil de biomarcadores que reflejen la severidad de la injuria del tejido cardíaco en pacientes con infección crónica²⁷⁶. La dilatación ventricular izquierda es uno de los principales síntomas en los pacientes con Chagas crónico que presentan insuficiencia cardíaca de pronóstico desfavorable, mientras que un marcado aumento del nivel de PCR-AS circulante ha sido detectado en las formas más comprometidas de miocardiopatía chagásica humana^{13,214,248,249}. Aún cuando la elevación del nivel de MIF no esté relacionada exclusivamente con Chagas, su valoración podría complementarse con la determinación de otros mediadores inflamatorios en el intento por identificar aquellos casos bajo riesgo de evolucionar hacia estadios avanzados de disfunción cardíaca causada por *T. cruzi*.

El estudio en el modelo murino de Chagas crónico aporta información valiosa para relacionar el grado de histopatología cardiovascular con la expresión local de MIF. Más allá de las limitaciones naturales de los diferentes modelos experimentales de infección por *T. cruzi*, existe consenso acerca de la razonable correlación observada entre la patología animal y la humana²⁷⁷⁻²⁷⁹. En nuestra experiencia, hallamos una marcada expresión de MIF, tanto en cardiomiocitos como en el infiltrado inflamatorio, en el modelo murino utilizado para reproducir la etapa severa de la enfermedad de Chagas crónica humana. Estudios previos han revelado que el miocardio es una importante fuente de producción de MIF y que la injuria cardíaca induce la expresión de esta CQ en cardiomiocitos^{280,281}. Dicha inducción fue notoriamente atenuada en el corazón de los ratones que reprodujeron una infección indeterminada, lo que reafirma

la hipótesis planteada acerca de la asociación entre incremento progresivo de la expresión de MIF, daño inflamatorio y miocardiopatía chagásica crónica.

Como hemos demostrado mediante experimentos *in vitro*, MIF podría contribuir al daño cardiovascular estimulando la secreción de CQ proinflamatorias y ERO desde los leucocitos infiltrantes. En el contexto de la infección por *T. cruzi*, la actividad de MIF sería capaz de potenciar la liberación de TNF- α a partir de los macrófagos que constituyen una porción considerable del infiltrado inflamatorio en miocardio²⁵⁷. En línea con esta posibilidad, se ha verificado una sobreexpresión de TNF- α en lesiones cardíacas asociadas con la progresión de la miocarditis chagásica^{227,282}. Además, MIF podría incrementar la generación de ERO en los fagocitos, probablemente a través de un mecanismo dependiente de NADPH oxidasa¹⁸². Es cada vez mayor la evidencia acerca de la contribución del estrés oxidativo prolongado a la evolución desfavorable de la miocardiopatía chagásica¹¹⁵. La producción de ERO por células del corazón y/o del infiltrado inflamatorio, puede originar carbonilación de proteínas, lipoperoxidación en membranas y alteración del ADN en tejidos cardiovasculares, lo cual provoca el desequilibrio oxidante/anti-oxidante y la disfunción mitocondrial que favorecen el desarrollo de daño muscular cardíaco^{283,284}. En conjunto, nuestros hallazgos apuntan a que, durante la infección crónica por *T. cruzi*, MIF actuaría como un agente de injuria inflamatoria en miocardio fundamentalmente por medio del reclutamiento progresivo y la activación sostenida de células mononucleares.

MIF ha sido descripto como un mediador clave en el influjo de monocitos/macrófagos y células T, así como en el arresto de leucocitos en los tejidos inflamados²⁸⁵. Teniendo en cuenta su actividad quimiotáctica, parece razonable estimar que una producción local elevada de esta CQ proinflamatoria puede ser -al menos en parte- responsable del tráfico leucocitario hacia el corazón a lo largo de la infección con *T. cruzi*. Ya hemos señalado que la mayor expresión local de MIF en ratones con miocardiopatía chagásica severa se detectó en el tejido cardíaco que presentaba un importante infiltrado inflamatorio. En coincidencia con estudios previos^{86,286,287}, el análisis fenotípico de los infiltrados aislados del miocardio de estos animales reveló un predominio de linfocitos T CD8⁺, y en menor medida T CD4⁺, acompañado por una subpoblación numerosa de leucocitos que expresaban CD11b en su superficie. A estos últimos probablemente corresponda caracterizarlos como monocitos/macrófagos, ya que resulta infrecuente la presencia de células polimorfonucleares infiltrantes en este

estadio de la infección chagásica murina⁸⁶. Sin embargo, se ha descrito que las células supresoras derivadas de linaje mieloide, con un fenotipo CD11b⁺Gr1⁺, también pueden infiltrar tejidos cardíacos en ratones infectados con *T. cruzi*²⁸⁸. En relación con esto, cabe destacar que MIF es capaz de aumentar la prevalencia y promover la diferenciación de una subpoblación de este tipo celular con marcada actividad inmunosupresora²⁸⁹.

El análisis del infiltrado inflamatorio establecido en miocardio de ratones con infección crónica mostró además que una fracción de la subpoblación predominante T CD8⁺ co-expresaba el receptor CXCR3 en su membrana celular. En concordancia, se halló en estos animales ese mismo patrón de expresión en una porción de células mononucleares circulantes. Un incremento en los niveles de CXCL9 en los tejidos cardíacos podría funcionar entonces como una señal de reclutamiento selectivo y activación proinflamatoria para esas células T CD8⁺ CXCR3⁺. En apoyo de esta hipótesis, la interacción CXCL9/CXCR3 ha sido postulada previamente como un mecanismo importante para el desarrollo y la intensificación del daño cardiovascular ocasionado por la infección prolongada con *T. cruzi*^{207,219,222}. En el mismo sentido, la expresión aumentada del receptor CCR5 observada en corazón y musculatura estriada de ratones con Chagas crónico también podría asociarse a la patogénesis inflamatoria promovida por el parásito en estos tejidos^{218,290}.

Además de actuar como mediador inflamatorio, MIF podría por otro lado contribuir a preservar las células del músculo cardíaco protegiéndolas de la apoptosis resultante de la interacción con el parásito y favorecer así el establecimiento de una infección por *T. cruzi* a largo plazo en miocardio. Como parte de la teoría patogénica multifactorial, se ha incluido a la apoptosis de cardiomiocitos en la nómina de los numerosos mecanismos que intervienen en la generación y progresión de la miocardiopatía chagásica crónica²⁹¹. A partir de la infección de miocitos cardíacos con *T. cruzi*, la respuesta pro- o anti-apoptótica parece variar en función de las características genéticas y fenotípicas del tipo celular hospedador y de la cepa de parásito infectante²⁹². Se ha observado que la expresión génica asociada con la regulación a favor o en contra de la apoptosis de la célula parasitada es pasible de ser modulada en forma diferencial durante la interacción *T. cruzi*-cardiomiocito, conduciendo a un equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular en el curso del proceso infeccioso²⁹³. Nuestros hallazgos en cultivos de cardiomiocitos HL-1 muestran

que *T. cruzi* primariamente es capaz de inducir *per se* apoptosis en esta línea celular, reflejada en un marcado encogimiento de las células infectadas y un mayor grado de fragmentación de su ADN. Este efecto pro-apoptosis de miofibras cardíacas gatillado por el parásito está en concordancia con lo reportado por otros investigadores, tanto *in vitro* como *in vivo*^{176,291,293-295}. Con interés verificamos que el tratamiento con MIF exógeno, de modo análogo a lo descrito para α -2-macroglobulina²⁹⁶, permite inhibir en forma significativa la muerte programada de cardiomiocitos como consecuencia de la infección por *T. cruzi*. Este efecto no debe atribuirse a una actividad parasitocida de MIF ya que, como se ha señalado más arriba, la misma no se hace evidente en miocitos cardíacos. Resulta habitual que ciertos mediadores inmunes promuevan eventos celulares tanto a favor como en detrimento de la apoptosis, en función de la naturaleza y estado de activación de la célula, así como del contexto fisiológico²⁹⁷. Con respecto a MIF, en distintos tipos celulares se lo ha asociado tanto con la inducción como, más frecuentemente, con la inhibición de apoptosis (en este caso por interferencia de p53, Bim y factores de estrés oxidativo)²⁹⁸⁻³⁰¹. En lo relativo a la miocarditis chagásica, cabe especular que la liberación de MIF por acción del *T. cruzi* sobre los leucocitos que infiltran el corazón, favorecería la actividad anti-apoptótica de la CQ sobre cardiomiocitos y podría considerarse como un mecanismo compensatorio del efecto pro-apoptótico que el parásito es capaz de generar al invadir la fibra muscular cardíaca. Esto responde a una estrategia compartida por muchos patógenos intracelulares que redireccionan los circuitos apoptóticos de la célula hospedadora en procura de su propia supervivencia y/o diseminación dentro del organismo infectado, mientras que paralelamente buscan persistir en un tejido clave y limitar el daño histopatológico en el sitio de infección^{302,303}.

También buscamos evaluar si el tratamiento etiológico con BZ provoca algún impacto sobre los niveles de expresión de CQ proinflamatorias, incluyendo MIF. Se ha reportado que, más allá de su actividad parasitocida directa, BZ es capaz de ejercer un efecto regulatorio sobre la respuesta inmune del individuo infectado⁴⁹. Por otra parte, en la infección con VIH se ha comprobado que el tratamiento antirretroviral logra revertir el incremento en los niveles de MIF asociado con la inmunopatogénesis²⁷³. En nuestra serie, al analizar muestras de células mononucleares circulantes y suero de pacientes pediátricos, obtenidas antes y después del tratamiento parasitocida con BZ, registramos una significativa tendencia decreciente para MIF y un descenso efectivo de IFN- γ a lo largo del seguimiento. Estos hallazgos se ubican en línea con la regulación

negativa de distintos mediadores inmunes (células T productoras de IFN- γ ; indolamina 2,3-dioxigenasa; CQ, P-selectina y VCAM-1 solubles) en respuesta al BZ, verificada en pacientes que cursan la etapa indeterminada de la infección chagásica³⁰⁴⁻³⁰⁶. Además, teniendo en cuenta la actual tendencia a la administración de tratamiento etiológico a pacientes que llevan tiempo prolongado de infección con *T. cruzi*³⁰⁷, evaluamos si la terapéutica con BZ durante la fase crónica de Chagas era capaz de modular la inducción de MIF. A través de un modelo experimental en ratón, encontramos que los animales crónicamente infectados que recibían el derivado nitroimidazólico presentaban una marcada disminución del índice inflamatorio y menor expresión de MIF en miocardio que aquellos infectados a los que no se les administraba la droga antichagásica. En conjunto, nuestros resultados indican que la reducción de los niveles de MIF sería otra de las consecuencias beneficiosas del efecto inmunorregulador del BZ, contribuyendo de esta forma a limitar una respuesta inflamatoria exacerbada en el hospedador y controlar su potencial patogénico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

- MIF es una CQ proinflamatoria cuya expresión promovida por el parásito se verifica tempranamente en el curso de la infección con *T. cruzi*.
- Durante la fase aguda, MIF es capaz de desempeñar un importante papel en la resistencia, potenciando la actividad parasitocida en los macrófagos, tanto *per se* como de modo sinérgico con IFN- γ .
- MIF es capaz de activar macrófagos para favorecer la eliminación de formas intracelulares del *T. cruzi* mediante mecanismos en los que participan ERO, TNF- α y NO.
- MIF se expresa en áreas de inflamación en tejidos musculares claves (miocardio y músculo esquelético) afectados por la infección reciente, tanto en las miofibras como en los leucocitos infiltrantes.
- Este incremento temprano de MIF muscular se localiza en un contexto inflamatorio caracterizado por un aumento generalizado en la expresión de CQ, QQ y RQQ, en paralelo con la severidad de la carga parasitaria y de la injuria tisular.
- Los pacientes pediátricos neonatos infectados por vía transplacentaria presentan altos niveles de MIF circulante que podrían formar parte de un mecanismo defensivo precoz frente al *T. cruzi*.
- El perfil de respuesta inflamatoria inicialmente necesaria para controlar la infección puede resultar perjudicial en caso de sostenerse su inducción a largo plazo; tal es lo que ocurre con MIF en pacientes crónicos con miocardiopatía chagásica severa.
- En dicho grupo encontramos correlaciones positivas entre la concentración sérica de MIF y parámetros ecocardiográficos y de laboratorio representativos de la gravedad de la disfunción cardíaca causada por la infección prolongada con *T. cruzi*.

- En coincidencia con esto, la expresión de MIF en miocardio de ratones con miocarditis crónica avanzada fue significativamente mayor que la observada en animales con infección crónica indeterminada.
- El incremento sostenido de MIF podría ser un factor patogénico en la etapa crónica de infección, contribuyendo al daño en corazón y musculatura esquelética mediante el reclutamiento y activación de células mononucleares productoras de CQ proinflamatorias y ERO.
- En ratones con infección crónica, se registró una inducción del RQQ CXCR3 en CMSP. El hallazgo de una fracción de la subpoblación T CD8⁺, predominante en el infiltrado inflamatorio crónico en miocardio de animales infectados, que co-expresa dicho receptor en su superficie sugiere que al menos algunas de estas células pueden migrar al tejido cardíaco.
- Además de actuar como mediador inflamatorio, MIF podría por otro lado contribuir a preservar las células del músculo cardíaco protegiéndolas de la apoptosis resultante de la interacción con el parásito y favorecer así el establecimiento de una infección por *T. cruzi* a largo plazo en miocardio.
- El BZ, administrado en la etapa crónica, podría modular negativamente la expresión de MIF, ayudando a limitar una respuesta inflamatoria exacerbada en el hospedador y la injuria en órganos claves del hospedador.

En vista de nuestros resultados, concluimos que MIF es un factor importante para el control del parásito en el período inicial de la infección, pero de persistir su inducción durante la etapa crónica podría convertirse en un mediador inflamatorio que puede participar de mecanismos inmunopatogénicos que aporten a la progresiva disfunción cardíaca generada por *T. cruzi*. El tratamiento etiológico con benznidazol durante la infección crónica sería capaz de ejercer un efecto inmunomodulador sobre MIF, de modo de mantener bajo control su potencial patogénico. En conjunto, estas observaciones contribuyen a esclarecer los elementos involucrados en la patogénesis de la miocardiopatía chagásica y podrían ser útiles en el diseño de terapias novedosas para controlar la morbilidad a largo plazo en los pacientes chagásicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas:

1. WHO, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/index.html>, (2012).
2. Rassi, A., Jr., Rassi, A. & Marin-Neto, J.A. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-1402 (2010).
3. Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>, (2012).
4. WHO. Control and prevention of Chagas disease in Europe: report of a WHO informal consultation (jointly organized by WHO headquarters and the WHO Regional Office for Europe) Geneva, Switzerland, 17 to 18 December 2009. WHO/HTM/NTD/IDM/2010.1. http://www.fac.org.ar/1/comites/chagas/Chagas_WHO_Technical%20Report_16_06_10.pdf, (2010).
5. Programa Nacional de Chagas, Ministerio de Salud de la Nación, <http://www.msal.gov.ar/chagas/index.php/institucional/diagnostico>, (2012).
6. Guhl, F. Revisión actualizada sobre la epidemiología del Chagas en América Latina. En *Chagas en el siglo XXI - De la enfermedad a la problemática social*, (ed. Akadia, L.) 37-49 (Bs As, 2010).
7. Schmunis, G.A. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 31, 547-557 (1991).
8. Pinto Dias, J. Aspectos del Chagas en la secuencia de su control. En *Chagas en el siglo XXI - De la enfermedad a la problemática social*, (ed. Akadia) 25-35 (Bs As, 2010).
9. González Cappa, S. & Durante de Isola, E. Agente Etiológico: *Trypanosoma cruzi*. En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei*, (ed. S.A, M.-D.A.) 31-40 (Times Mirror de España S.A, Bs As, 1994).
10. Durante de Isola, E. & González Cappa, S. Vectores transmisores: triatomíneos, "vinchucas". En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei*, (ed. S.A, M.-D.A.) 41-50 (Times Mirror de España S.A, Bs As, 1994).
11. Storino, R.A., Jörg, M. & Auger, S. En *Atención médica del paciente chagásico. Manual práctico. Un enfoque biológico, antropológico y social*, (ed. Ediprof) (Bs As, 2003).
12. Benjamin, R.J., Stramer, S.L., Leiby, D.A., Dodd, R.Y., Fearon, M. & Castro, E. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. *Transfusion* 52, 1913-1921; quiz 1912 (2012).
13. Milei, J., Ferrans, V., Meira de Oliveira, J.S., Rossi, L., Maturri, L., Caputi, E., Sánchez, J. & Yu, Z.Y. Patología. En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei*, (ed. S.A, M.-D.A.) 141-184 (Times Mirror de España S.A, Bs As, 1994).

14. Lugones, H., Ledesma, O., Storino, R.A., Marteleur, A., Ribas Menecler, C. & Barbieri, G. Chagas agudo. En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei*, (ed. S.A, M.-D.A.) 209-234 (Times Mirror de España S.A, Bs as, 1994).
15. Dias, J.C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop* 22, 147-156 (1989).
16. Storino, R.A. Etapas clínicas de la Enfermedad de Chagas. En *Chagas en el siglo XXI - De la enfermedad a la problemática social.*, (ed. Akadia) 127-136 (Bs As, 2010).
17. Lescure, F.X., Le Loup, G., Freilij, H., Develoux, M., Paris, L., Brutus, L. & Pialoux, G. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 10, 556-570 (2010).
18. Mitelman, J.E; Descalzo, A; Gimenez, L; Pesce, R; Romero Villanueva, H. Consenso de Enfermedad Chagas-Mazza. *Revista Argentina de Cardiología* 79, 544-564 (2011).
19. Andrade, Z.A. Mechanisms of myocardial damage in Trypanosoma cruzi infection. *Ciba Found Symp* 99, 214-233 (1983).
20. Viotti, R., Vigliano, C.A., Alvarez, M.G., Lococo, B.E., Petti, M.A., Bertocchi, G.L. & Armenti, A.H. The impact of socioeconomic conditions on chronic Chagas disease progression. *Rev Esp Cardiol* 62, 1224-1232 (2009).
21. Storino, R.A., Auger, S., Wojdyla, D., Urrutia, M.I. & Jörg, M. Análisis descriptivo multivariado de la enfermedad de Chagas en 2260 pacientes. Premio Fundación Dr. Pedro Cossio. *Revista Argentina de Cardiología* 66, 17-39 (1998).
22. Storino, R. Chagas Crónico. En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei*, (ed. S.A, M.-D.A.) 247-266 (Times Mirror de España S.A, Bs As, 1994).
23. Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Alvarez, M.G. & Armenti, A. Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression. *Rev Esp Cardiol* 58, 1037-1044 (2005).
24. Köberle, F. Patogenia da molestia de Chagas. *Revista Goiana de Medicina* 3, 155-180 (1957).
25. Milei, J. Patogenia. En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei*, (ed. S.A, M.-D.A.) 103-128 (Times Mirror de España S.A, Bs As, 1994).
26. Freilij, H. & Altchek, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis* 21, 551-555 (1995).
27. Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H. & Albajar Vinas, P. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1250 (2011).

28. Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J.M., Diez, M., Levin, M.J., Favaloro, R.R., Freilij, H. & Schijman, A.G. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e419 (2009).
29. Storino, R.M., J. Introducción. En *Enfermedad de Chagas*, (ed. Arg., M.-D.) 1-7 (Buenos Aires, 1994).
30. Storino, R., Gallerano, R. & Sosa, R. Tratamiento antiparasitario específico. En *Enfermedad de Chagas*, (ed. Arg., M.-D.) 557-568 (Times Mirror de España S.A, Bs As, 1994).
31. Rodriques Coura, J. & de Castro, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 3-24 (2002).
32. Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M., Galanti, N., Ferreira, A. & Morello, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146, 601-620 (2007).
33. Filardi, L.S. & Brener, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81, 755-759 (1987).
34. Maya, J.D., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., Lopez-Munoz, R. & Morello, A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res* 43, 323-331 (2010).
35. Freilij, H., Altcheh, J. & Storino, R. Chagas congénito. En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei.*, (ed. S.A, M.-D.A.) 267-278 (Times Mirror España., Bs As, 1994).
36. Altcheh, J., Moscatelli, G., Moroni, S., Garcia-Bournissen, F. & Freilij, H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics* 127, e212-218 (2011).
37. Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M.G., Petti, M., Bertocchi, G. & Armenti, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7, 157-163 (2009).
38. Control of Chagas Disease Second Report of the WHO Expert Committee., (World Health Organization Expert Committee on the control of Chagas Disease., 2002).
39. Altcheh, J., Biancardi, M., Lapena, A., Ballering, G. & Freilij, H. [Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Ninos, Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina]. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 Suppl 2, 41-45 (2005).
40. Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H. & Segura, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 127, 151-162 (1994).

41. Sosa Estani, S., Segura, E.L., Ruiz, A.M., Velazquez, E., Porcel, B.M. & Yampotis, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59, 526-529 (1998).
42. Cancado, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44, 29-37 (2002).
43. Alvarez, M.G., Vigliano, C., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G. & Viotti, R. Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106, 636-638 (2012).
44. Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M.G., Postan, M. & Armenti, A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144, 724-734 (2006).
45. Marin-Neto, J.A., Rassi, A., Jr., Morillo, C.A., Avezum, A., Connolly, S.J., Sosa-Estani, S., Rosas, F., Yusuf, S. & Investigators, B. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 156, 37-43 (2008).
46. Revelli, S., Le Page, C., Piaggio, E., Wietzerbin, J. & Bottasso, O. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* 118, 271-277 (1999).
47. Piaggio, E., Sanceau, J., Revelli, S., Bottasso, O., Wietzerbin, J. & Serra, E. Trypanocidal drug benznidazole impairs lipopolysaccharide induction of macrophage nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF-kappaB activation. *J Immunol* 167, 3422-3426 (2001).
48. Olivieri, B.P., Cotta-De-Almeida, V. & Araujo-Jorge, T. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3790-3796 (2002).
49. Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D.M., Massara, R.L., Borges, J.D., Lana, M., Teixeira-Carvalho, A., Dias, J.C., Eloi-Santos, S.M. & Martins-Filho, O.A. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol* 64, 554-563 (2006).
50. Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D.M., Massara, R.L., de Lana, M., Pinto Dias, J.C., Teixeira-Carvalho, A., Eloi-Santos, S.M. & Martins-Filho, O.A. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes Infect* 10, 103-113 (2008).
51. Laucella, S.A., Mazliah, D.P., Bertocchi, G., Alvarez, M.G., Cooley, G., Viotti, R., Albareda, M.C., Lococo, B., Postan, M., Armenti, A. & Tarleton, R.L. Changes in

- Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. *Clin Infect Dis* 49, 1675-1684 (2009).
52. Fabbro, D.L., Olivera, V., Bizai, M.L., Denner, S., Diez, C., Marcipar, I., Streiger, M., Arias, E., del Barco, M., Mendicino, D. & Bottasso, O. Humoral immune response against P2beta from *Trypanosoma cruzi* in persons with chronic Chagas disease: its relationship with treatment against parasites and myocardial damage. *Am J Trop Med Hyg* 84, 575-580 (2011).
 53. Cutrullis, R.A., Moscatelli, G.F., Moroni, S., Volta, B.J., Cardoni, R.L., Altcheh, J.M., Corral, R.S., Freilij, H.L. & Petray, P.B. Benznidazole therapy modulates interferon-gamma and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children. *PLoS One* 6, e27133 (2011).
 54. WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484340>, v-xii, 1-100 (2012).
 55. El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaude, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D. & Andersson, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-415 (2005).
 56. Atwood, J.A., 3rd, Weatherly, D.B., Minning, T.A., Bundy, B., Cavola, C., Oppenheimer, F.R., Orlando, R. & Tarleton, R.L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309, 473-476 (2005).
 57. Garg, N. & Bhatia, V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Rev Vaccines* 4, 867-880 (2005).
 58. Cazorla, S.I., Frank, F.M. & Malchiodi, E.L. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Rev Vaccines* 8, 921-935 (2009).
 59. Storino, R.A. Mecanismos patogénicos involucrados en la enfermedad de Chagas. En *Chagas en el siglo XXI - De la enfermedad a la problemática social*, (ed. Akadia) 85-93 (Bs As, 2010).
 60. Vazquez, M.C., Riarte, A., Pattin, M. & Lauricella, M. Chagas' disease can be transmitted through kidney transplantation. *Transplant Proc* 25, 3259-3260 (1993).

61. Tarleton, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 31, 550-554 (2001).
62. Jörg, M. Tripanosomiasis cruzi; anarquía angiotopográfica por descapilarización mesenquimo-reactiva, cofactor patogénico de la miocardiopatía crónica. *Prensa Médica Argentina* 61, 94-106 (1974).
63. Leon, J.S. & Engman, D.M. Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol* 31, 555-561 (2001).
64. Rocha, M.O., Ribeiro, A.L. & Teixeira, M.M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci* 8, e44-54 (2003).
65. Tarleton, R.L. & Zhang, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15, 94-99 (1999).
66. Anez, N., Carrasco, H., Parada, H., Crisante, G., Rojas, A., Fuenmayor, C., Gonzalez, N., Percoco, G., Borges, R., Guevara, P. & Ramirez, J.L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 60, 726-732 (1999).
67. Chagas, C. Les formes nerveuses d'une nouvelle Trypanosomiase (*Trypanosoma cruzi* inoculé par *Triatoma megista*) (Maladie de Chagas). *Nouvelle iconographie de la Salpêtrière, clinique des maladies du système nerveux* 26, 1-9 (1913).
68. Caeiro, T. Alteración del Sistema Nervioso Autónomo. En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei*, (ed. S.A, M.-D.A.) 321-330 (Times Mirror de España S.A, Bs As, 1994).
69. Miranda, C.H., Figueiredo, A.B., Maciel, B.C., Marin-Neto, J.A. & Simoes, M.V. Sustained ventricular tachycardia is associated with regional myocardial sympathetic denervation assessed with 123I-metaiodobenzylguanidine in chronic Chagas cardiomyopathy. *J Nucl Med* 52, 504-510 (2011).
70. Talvani, A., Rocha, M.O., Ribeiro, A.L., Borda, E., Sterin-Borda, L. & Teixeira, M.M. Levels of anti-M2 and anti-beta1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. *Microbes Infect* 8, 2459-2464 (2006).
71. Borda, E.S. & Sterin-Borda, L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 54, 149-156 (1996).
72. Freedman, N.J. & Lefkowitz, R.J. Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest* 113, 1379-1382 (2004).
73. Ferrari, I., Levin, M.J., Wallukat, G., Elies, R., Lebesgue, D., Chiale, P., Elizari, M., Rosenbaum, M. & Hoebcke, J. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *J Exp Med* 182, 59-65 (1995).

74. Labovsky, V., Smulski, C.R., Gomez, K., Levy, G. & Levin, M.J. Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol* 148, 440-449 (2007).
75. Kierszenbaum, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol* 21, 513-516 (2005).
76. Magarinos Torres, C. Arteriosclerose das finas ramificacoes arteriais do miocardio (coronarite chagásica) e miocitólise focal do miocárdio na cardiopatia chagásica crônica. *Hospital* 54, 597 (1958).
77. Rossi, M.A. & Carobrez, S.G. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. *Br J Exp Pathol* 66, 155-160 (1985).
78. Rossi, M.A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. *Am Heart J* 120, 233-236 (1990).
79. Tanowitz, H.B., Morris, S.A., Factor, S., Weiss, L.M. & Wittner, M. Parasitic disease of the heart I: Acute and chronic Chagas' disease. *Cardiovascular Pathology* 1, 7-15 (1992).
80. Cardoni, R. Respuesta Inmune Efectora. En *Enfermedad de Chagas - Storino & Milei.*, (ed. S.A, M.-D.A.) 87-102 (Bs As, 1994).
81. Sun, J. & Tarleton, R.L. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 48, 161-169 (1993).
82. Rocha Rodrigues, D.B., dos Reis, M.A., Romano, A., Pereira, S.A., Teixeira Vde, P., Tostes, S., Jr. & Rodrigues, V., Jr. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol* 2012, 361730 (2012).
83. da Matta Guedes, P.M., Gutierrez, F.R., Maia, F.L., Milanezi, C.M., Silva, G.K., Pavanelli, W.R. & Silva, J.S. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e604 (2010).
84. Talvani, A. & Teixeira, M.M. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. *Adv Parasitol* 76, 171-194 (2011).
85. Padilla, A.M., Bustamante, J.M. & Tarleton, R.L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol* 21, 385-390 (2009).
86. Talvani, A., Ribeiro, C.S., Aliberti, J.C., Michailowsky, V., Santos, P.V., Murta, S.M., Romanha, A.J., Almeida, I.C., Farber, J., Lannes-Vieira, J., Silva, J.S. & Gazzinelli, R.T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 2, 851-866 (2000).

87. Higuchi Mde, L., Benvenuti, L.A., Martins Reis, M. & Metzger, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res* 60, 96-107 (2003).
88. Cunha Neto, E. Rethinking the pathogenesis of chronic chagasic cardiopathy at the closing of the millennium. *Medicina (B Aires)* 59, 496-500 (1999).
89. Cossio, P.M., Laguens, R.P., Diez, C., Szarfman, A., Segal, A. & Arana, R.M. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50, 1252-1259 (1974).
90. Cossio, P.M., Diez, C., Szarfman, A., Kreutzer, E., Candiolo, B. & Arana, R.M. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49, 13-21 (1974).
91. Khoury, E.L., Ritacco, V., Cossio, P.M., Laguens, R.P., Szarfman, A., Diez, C. & Arana, R.M. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin Exp Immunol* 36, 8-15 (1979).
92. Mazza, S. & Jörg, M. Consideraciones sobre la patogenia de la enfermedad de Chagas. Los períodos anatomoclínicos de la tripanosomiasis. En *Actas 9na Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional.*, Vol. I (ed. UNBA) 221. (Mendoza, 1936).
93. Tarleton, R. Pathology of American trypanosomiasis. En *Immunology and molecular biology of parasitic infections.*, (ed. KS., W.) 64-71 (Blackwell, London, 1993).
94. Plata, F., Garcia-Pons, F. & Wietzerbin, J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. *Ann Inst Pasteur Immunol* 138, 397-415 (1987).
95. Nabors, G.S. & Tarleton, R.L. Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 146, 3591-3598 (1991).
96. Leite de Moraes, M.C., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Leboulenger, F., Savino, W., Dardenne, M. & Lepault, F. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: relationship to stress. *Scand J Immunol* 33, 267-275 (1991).
97. Truyens, C., Angelo-Barrios, A., Torrico, F., Van Damme, J., Heremans, H. & Carlier, Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infect Immun* 62, 692-696 (1994).
98. Silva, J.S., Aliberti, J.C., Martins, G.A., Souza, M.A., Souto, J.T. & Padua, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res* 31, 111-115 (1998).

99. Eickhoff, C.S., Vasconcelos, J.R., Sullivan, N.L., Blazevic, A., Bruna-Romero, O., Rodrigues, M.M. & Hoft, D.F. Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e983 (2011).
100. Guedes, P.M., Gutierrez, F.R., Silva, G.K., Dellalibera-Joviliano, R., Rodrigues, G.J., Bendhack, L.M., Rassi, A., Jr., Rassi, A., Schmidt, A., Maciel, B.C., Marin Neto, J.A. & Silva, J.S. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1630 (2012).
101. Antunez, M.I. & Cardoni, R.L. Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* 79, 189-196 (2001).
102. Erdmann, H., Rossnagel, C., Bohme, J., Iwakura, Y., Jacobs, T., Schaible, U.E. & Holscher, C. IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment. *Immunobiology* 6, 218, 910-923 (2013).
103. Nogueira, N., Ellis, J., Chaplan, S. & Cohn, Z. *Trypanosoma cruzi*: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp Parasitol* 51, 325-334 (1981).
104. Tarleton, R.L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 144, 717-724 (1990).
105. Rottenberg, M., Cardoni, R.L., Andersson, R., Segura, E.L. & Orn, A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol* 28, 573-582 (1988).
106. Hoft, D.F., Eickhoff, C.S., Giddings, O.K., Vasconcelos, J.R. & Rodrigues, M.M. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. *J Immunol* 179, 6889-6900 (2007).
107. Tarleton, R.L. & Kuhn, R.E. Changes in cell populations and immunoglobulin-producing cells in the spleens of mice infected with *Trypanosoma cruzi*: correlations with parasite-specific antibody response. *Cell Immunol* 80, 392-404 (1983).
108. Kumar, S. & Tarleton, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 20, 207-216 (1998).
109. Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D.C., Melo, M.B., Ropert, C., Rodrigues, M.M. & Gazzinelli, R.T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 12, e29 (2010).

- 110.** Tanaka, Y., Tanowitz, H. & Bloom, B.R. Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. *Infect Immun* 41, 1322-1331 (1983).
- 111.** Petray, P., Rottenberg, M.E., Grinstein, S. & Orn, A. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 16, 193-199 (1994).
- 112.** Silva, J.S., Machado, F.S. & Martins, G.A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci* 8, s314-325 (2003).
- 113.** Gutierrez, F.R., Mineo, T.W., Pavanelli, W.R., Guedes, P.M. & Silva, J.S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 236-245 (2009).
- 114.** Cardoni, R.L., Rottenberg, M.E. & Segura, E.L. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Immunol* 128, 11-21 (1990).
- 115.** Gupta, S., Wen, J.J. & Garg, N.J. Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009, 190354 (2009).
- 116.** Tarleton, R.L., Grusby, M.J. & Zhang, L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 165, 1520-1525 (2000).
- 117.** Boscardin, S.B., Torrecilhas, A.C., Manarin, R., Revelli, S., Rey, E.G., Tonelli, R.R. & Silber, A.M. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med* 14, 1373-1384 (2010).
- 118.** Nomizo, A., Cardillo, F., Postol, E., de Carvalho, L.P. & Mengel, J. V gamma 1 gammadelta T cells regulate type-1/type-2 immune responses and participate in the resistance to infection and development of heart inflammation in *Trypanosoma cruzi*-infected BALB/c mice. *Microbes Infect* 8, 880-888 (2006).
- 119.** Duthie, M.S., Wleklinski-Lee, M., Smith, S., Nakayama, T., Taniguchi, M. & Kahn, S.J. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein. *Infect Immun* 70, 36-48 (2002).
- 120.** Alba Soto, C.D., Mirkin, G.A., Solana, M.E. & Gonzalez Cappa, S.M. *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect Immun* 71, 1194-1199 (2003).
- 121.** Poncini, C.V., Alba Soto, C.D., Batalla, E., Solana, M.E. & Gonzalez Cappa, S.M. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. *Infect Immun* 76, 2633-2641 (2008).

- 122.** Thornton, A.M. & Shevach, E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296 (1998).
- 123.** Rouse, B.T., Sarangi, P.P. & Suvas, S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev* 212, 272-286 (2006).
- 124.** Belkaid, Y., Sun, C.M. & Bouladoux, N. Parasites and immunoregulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 18, 406-412 (2006).
- 125.** Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R. & Roncarolo, M.G. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol* 18, 120-127 (2006).
- 126.** Flores-Garcia, Y., Rosales-Encina, J.L., Rosales-Garcia, V.H., Satoskar, A.R. & Talamas-Rohana, P. CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) Treg Cells Induced by rSSP4 Derived from *T. cruzi* Amastigotes Increase Parasitemia in an Experimental Chagas Disease Model. *Biomed Res Int* 2013, 632436 (2013).
- 127.** de Araujo, F.F., Correa-Oliveira, R., Rocha, M.O., Chaves, A.T., Fiuza, J.A., Fares, R.C., Ferreira, K.S., Nunes, M.C., Keesen, T.S., Damasio, M.P., Teixeira-Carvalho, A. & Gomes, J.A. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology* 217, 768-777 (2012).
- 128.** Hoft, D.F., Lynch, R.G. & Kirchhoff, L.V. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 151, 7038-7047 (1993).
- 129.** Reed, S.G., Brownell, C.E., Russo, D.M., Silva, J.S., Grabstein, K.H. & Morrissey, P.J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 153, 3135-3140 (1994).
- 130.** Dutra, W.O., Gollob, K.J., Pinto-Dias, J.C., Gazzinelli, G., Correa-Oliveira, R., Coffman, R.L. & Carvalho-Parra, J.F. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand J Immunol* 45, 74-80 (1997).
- 131.** Powell, M.R., Morgan, J., Guarner, J. & Colley, D.G. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 20, 463-471 (1998).
- 132.** Munoz-Fernandez, M.A., Fernandez, M.A. & Fresno, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 22, 301-307 (1992).
- 133.** Perez-Fuentes, R., Lopez-Colombo, A., Ordonez-Toquero, G., Gomez-Albino, I., Ramos, J., Torres-Rasgado, E., Salgado-Rosas, H., Romero-Diaz, M., Pulido-Perez, P. & Sanchez-Guillen, M.C. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas

- disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 101, 123-132 (2007).
- 134.** Martin, D. & Tarleton, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev* 201, 304-317 (2004).
 - 135.** Albareda, M.C., Laucella, S.A., Alvarez, M.G., Armenti, A.H., Bertochi, G., Tarleton, R.L. & Postan, M. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 18, 465-471 (2006).
 - 136.** Stockinger, B. & Veldhoen, M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 281-286 (2007).
 - 137.** Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R.I. & Lord, G.M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148, 32-46 (2007).
 - 138.** Gonzalez-Lombana, C., Gimblet, C., Bacellar, O., Oliveira, W.W., Passos, S., Carvalho, L.P., Goldschmidt, M., Carvalho, E.M. & Scott, P. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. *PLoS Pathog* 9, e1003243 (2013).
 - 139.** Magalhaes, L.M., Villani, F.N., Nunes Mdo, C., Gollob, K.J., Rocha, M.O. & Dutra, W.O. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis* 207, 661-665 (2013).
 - 140.** Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimano, Y., Iwakura, Y. & Yoshida, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 185, 1150-1157 (2010).
 - 141.** Bahia-Oliveira, L.M., Gomes, J.A., Rocha, M.O., Moreira, M.C., Lemos, E.M., Luz, Z.M., Pereira, M.E., Coffman, R.L., Dias, J.C., Cancado, J.R., Gazzinelli, G. & Correa-Oliveira, R. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res* 31, 127-131 (1998).
 - 142.** Cunha-Neto, E., Dzau, V.J., Allen, P.D., Stamatiou, D., Benvenuto, L., Higuchi, M.L., Koyama, N.S., Silva, J.S., Kalil, J. & Liew, C.C. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 167, 305-313 (2005).
 - 143.** D'Avila, D.A., Guedes, P.M., Castro, A.M., Gontijo, E.D., Chiari, E. & Galvao, L.M. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 100-105 (2009).
 - 144.** Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, H., Schaub, G.A. & Brombacher, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 66, 1208-1215 (1998).

- 145.** Michailowsky, V., Silva, N.M., Rocha, C.D., Vieira, L.Q., Lannes-Vieira, J. & Gazzinelli, R.T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 159, 1723-1733 (2001).
- 146.** Cardoni, R.L., Garcia, M.M. & De Rissio, A.M. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 90, 65-72 (2004).
- 147.** Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Rodriguez, P., Berthe, A., Torrico, F. & Carlier, Y. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. *J Infect Dis* 189, 1274-1281 (2004).
- 148.** Souza, P.E., Rocha, M.O., Rocha-Vieira, E., Menezes, C.A., Chaves, A.C., Gollob, K.J. & Dutra, W.O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 72, 5283-5291 (2004).
- 149.** Talvani, A., Rocha, M.O., Barcelos, L.S., Gomes, Y.M., Ribeiro, A.L. & Teixeira, M.M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 38, 943-950 (2004).
- 150.** Ferreira, R.C., Ianni, B.M., Abel, L.C., Buck, P., Mady, C., Kalil, J. & Cunha-Neto, E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 407-411 (2003).
- 151.** Rodriguez-Perez, J.M., Cruz-Robles, D., Hernandez-Pacheco, G., Perez-Hernandez, N., Murguia, L.E., Granados, J., Reyes, P.A. & Vargas-Alarcon, G. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett* 98, 97-102 (2005).
- 152.** Drigo, S.A., Cunha-Neto, E., Ianni, B., Cardoso, M.R., Braga, P.E., Fae, K.C., Nunes, V.L., Buck, P., Mady, C., Kalil, J. & Goldberg, A.C. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect* 8, 598-603 (2006).
- 153.** Criado, L., Florez, O., Martin, J. & Gonzalez, C.I. Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine* 57, 398-401 (2012).
- 154.** Drigo, S.A., Cunha-Neto, E., Ianni, B., Mady, C., Fae, K.C., Buck, P., Kalil, J. & Goldberg, A.C. Lack of association of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. *Immunol Lett* 108, 109-111 (2007).
- 155.** Kubota, T., McTiernan, C.F., Frye, C.S., Slawson, S.E., Lemster, B.H., Koretsky, A.P., Demetris, A.J. & Feldman, A.M. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* 81, 627-635 (1997).

- 156.** Perez, A.R., Fontanella, G.H., Nocito, A.L., Revelli, S. & Bottasso, O.A. Short treatment with the tumour necrosis factor-alpha blocker infliximab diminishes chronic chagasic myocarditis in rats without evidence of *Trypanosoma cruzi* reactivation. *Clin Exp Immunol* 157, 291-299 (2009).
- 157.** Aliberti, J.C., Souto, J.T., Marino, A.P., Lannes-Vieira, J., Teixeira, M.M., Farber, J., Gazzinelli, R.T. & Silva, J.S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 158, 1433-1440 (2001).
- 158.** Lannes-Vieira, J., Pereira, I.R., Vinagre, N.F. & Arnez, L.E. TNF-alpha and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. *Adv Exp Med Biol* 691, 221-230 (2011).
- 159.** David, J.R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 72-77 (1966).
- 160.** Baugh, J.A. & Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 30, S27-S35 (2002).
- 161.** Takase, H., Sugita, S., Rhee, D.J., Imai, Y., Taguchi, C., Sugamoto, Y., Tagawa, Y., Nishihira, J., Russell, P. & Mochizuki, M. The presence of macrophage migration inhibitory factor in human trabecular meshwork and its upregulatory effects on the T helper 1 cytokine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2691-2696 (2002).
- 162.** Amin, M.A., Haas, C.S., Zhu, K., Mansfield, P.J., Kim, M.J., Lackowski, N.P. & Koch, A.E. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood* 107, 2252-2261 (2006).
- 163.** Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R. & Lolis, E. Crystal structure at 2.6-A resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5191-5196 (1996).
- 164.** Bucala, R. MIF re-discovered: pituitary hormone and glucocorticoid-induced regulator of cytokine production. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 19-24 (1996).
- 165.** Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C.N., Spiegel, L.A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A. & Bucala, R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377, 68-71 (1995).
- 166.** Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J.W., Lolis, E., Noble, P., Knudson, W. & Bucala, R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25, 595-606 (2006).
- 167.** Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zerneck, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J. & Weber, C. MIF

- is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13, 587-596 (2007).
- 168.** Schwartz, V., Kruttgen, A., Weis, J., Weber, C., Ostendorf, T., Lue, H. & Bernhagen, J. Role for CD74 and CXCR4 in clathrin-dependent endocytosis of the cytokine MIF. *Eur J Cell Biol* 91, 435-449 (2012).
 - 169.** Wennemuth, G., Aumuller, G., Bacher, M. & Meinhardt, A. Macrophage migration inhibitory factor-induced Ca(2+) response in rat testicular peritubular cells. *Biol Reprod* 62, 1632-1639 (2000).
 - 170.** Lue, H., Thiele, M., Franz, J., Dahl, E., Speckgens, S., Leng, L., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Luscher, B. & Bernhagen, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* 26, 5046-5059 (2007).
 - 171.** Oda, S., Oda, T., Nishi, K., Takabuchi, S., Wakamatsu, T., Tanaka, T., Adachi, T., Fukuda, K., Semenza, G.L. & Hirota, K. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PLoS One* 3, e2215 (2008).
 - 172.** Shan, Z.X., Lin, Q.X., Yang, M., Zhang, B., Zhu, J.N., Mai, L.P., Deng, C.Y., Liu, J.L., Zhang, Y.Y., Lin, S.G. & Yu, X.Y. Transcription factor Ap-1 mediates proangiogenic MIF expression in human endothelial cells exposed to Angiotensin II. *Cytokine* 53, 35-41 (2011).
 - 173.** Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376 (2003).
 - 174.** Baumann, R., Casaulta, C., Simon, D., Conus, S., Yousefi, S. & Simon, H.U. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J* 17, 2221-2230 (2003).
 - 175.** Dhanantwari, P., Nadaraj, S., Kenessey, A., Chowdhury, D., Al-Abed, Y., Miller, E.J. & Ojamaa, K. Macrophage migration inhibitory factor induces cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 371, 298-303 (2008).
 - 176.** Stahl, P., Ruppert, V., Meyer, T., Schmidt, J., Campos, M.A., Gazzinelli, R.T., Maisch, B., Schwarz, R.T. & Debierre-Grockiego, F. Trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi* induce apoptosis and STAT3 activation in cardiomyocytes in vitro. *Apoptosis* 10.1007/s10495-013-0822-x(2013).
 - 177.** Flieger, O., Engling, A., Bucala, R., Lue, H., Nickel, W. & Bernhagen, J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett* 551, 78-86 (2003).
 - 178.** Donn, R.P. & Ray, D.W. Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. *J Endocrinol* 182, 1-9 (2004).

- 179.** Lan, H.Y., Yang, N., Nikolic-Paterson, D.J., Yu, X.Q., Mu, W., Isbel, N.M., Metz, C.N., Bucala, R. & Atkins, R.C. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 57, 499-509 (2000).
- 180.** Calandra, T. & Roger, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 791-800 (2003).
- 181.** Gregory, J.L., Leech, M.T., David, J.R., Yang, Y.H., Dacumos, A. & Hickey, M.J. Reduced leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice. *Arthritis Rheum* 50, 3023-3034 (2004).
- 182.** Chuang, Y.C., Su, W.H., Lei, H.Y., Lin, Y.S., Liu, H.S., Chang, C.P. & Yeh, T.M. Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy via reactive oxygen species generation. *PLoS One* 7, e37613 (2012).
- 183.** Rosado Jde, D. & Rodriguez-Sosa, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections. *Int J Biol Sci* 7, 1239-1256 (2011).
- 184.** Reyes, J.L., Terrazas, L.I., Espinoza, B., Cruz-Robles, D., Soto, V., Rivera-Montoya, I., Gomez-Garcia, L., Snider, H., Satoskar, A.R. & Rodriguez-Sosa, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 74, 3170-3179 (2006).
- 185.** Terrazas, C.A., Huitron, E., Vazquez, A., Juarez, I., Camacho, G.M., Calleja, E.A. & Rodriguez-Sosa, M. MIF synergizes with *Trypanosoma cruzi* antigens to promote efficient dendritic cell maturation and IL-12 production via p38 MAPK. *Int J Biol Sci* 7, 1298-1310 (2011).
- 186.** Sher, A. & Coffman, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol* 10, 385-409 (1992).
- 187.** McDevitt, M.A., Xie, J., Shanmugasundaram, G., Griffith, J., Liu, A., McDonald, C., Thuma, P., Gordeuk, V.R., Metz, C.N., Mitchell, R., Keefer, J., David, J., Leng, L. & Bucala, R. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J Exp Med* 203, 1185-1196 (2006).
- 188.** Jain, V., McClintock, S., Nagpal, A.C., Dash, A.P., Stiles, J.K., Udhayakumar, V., Singh, N. & Lucchi, N.W. Macrophage migration inhibitory factor is associated with mortality in cerebral malaria patients in India. *BMC Res Notes* 2, 36 (2009).
- 189.** Cavalcanti, M.G., Mesquita, J.S., Madi, K., Feijo, D.F., Assuncao-Miranda, I., Souza, H.S. & Bozza, M.T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. *PLoS One* 6, e25259 (2011).
- 190.** Santos-Oliveira, J.R., Regis, E.G., Leal, C.R., Cunha, R.V., Bozza, P.T. & Da-Cruz, A.M. Evidence that lipopolysaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1198 (2011).

- 191.** Morand, E.F., Leech, M., Weedon, H., Metz, C., Bucala, R. & Smith, M.D. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations. *Rheumatology (Oxford)* 41, 558-562 (2002).
- 192.** Bozza, F.A., Gomes, R.N., Japiassu, A.M., Soares, M., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. & Bozza, M.T. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* 22, 309-313 (2004).
- 193.** Zerneck, A., Bernhagen, J. & Weber, C. Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* 117, 1594-1602 (2008).
- 194.** Kimura, K., Nagaki, M., Nishihira, J., Satake, S., Kuwata, K. & Moriwaki, H. Role of macrophage migration inhibitory factor in hepatitis B virus-specific cytotoxic-T-lymphocyte-induced liver injury. *Clin Vaccine Immunol* 13, 415-419 (2006).
- 195.** Regis, E.G., Barreto-de-Souza, V., Morgado, M.G., Bozza, M.T., Leng, L., Bucala, R. & Bou-Habib, D.C. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the plasma of HIV-1-infected patients and in HIV-1-infected cell cultures: a relevant role on viral replication. *Virology* 399, 31-38 (2010).
- 196.** Matsui, Y., Okamoto, H., Jia, N., Akino, M., Uede, T., Kitabatake, A. & Nishihira, J. Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 37, 557-566 (2004).
- 197.** Chen, P.F., Luo, Y.L., Wang, W., Wang, J.X., Lai, W.Y., Hu, S.M., Cheng, K.F. & Al-Abed, Y. ISO-1, a macrophage migration inhibitory factor antagonist, inhibits airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Mol Med* 16, 400-408 (2010).
- 198.** Hagman, S., Raunio, M., Rossi, M., Dastidar, P. & Elovaara, I. Disease-associated inflammatory biomarker profiles in blood in different subtypes of multiple sclerosis: prospective clinical and MRI follow-up study. *J Neuroimmunol* 234, 141-147 (2011).
- 199.** Muller, II, Muller, K.A., Schonleber, H., Karathanos, A., Schneider, M., Jorbenadze, R., Bigalke, B., Gawaz, M. & Geisler, T. Macrophage migration inhibitory factor is enhanced in acute coronary syndromes and is associated with the inflammatory response. *PLoS One* 7, e38376 (2012).
- 200.** Charo, I.F. & Ransohoff, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610-621 (2006).
- 201.** Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D. & Strieter, R.M. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68, 1-8 (2000).
- 202.** Mackay, C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2, 95-101 (2001).
- 203.** Luther, S.A. & Cyster, J.G. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2, 102-107 (2001).

204. Gerard, C. & Rollins, B.J. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2, 108-115 (2001).
205. Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15, 675-705 (1997).
206. Teixeira, M.M., Gazzinelli, R.T. & Silva, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 18, 262-265 (2002).
207. Nogueira, L.G., Santos, R.H., Ianni, B.M., Fiorelli, A.I., Mairena, E.C., Benvenuti, L.A., Frade, A., Donadi, E., Dias, F., Saba, B., Wang, H.T., Fragata, A., Sampaio, M., Hirata, M.H., Buck, P., Mady, C., Bocchi, E.A., Stolf, N.A., Kalil, J. & Cunha-Neto, E. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1867 (2012).
208. Aliberti, J.C., Machado, F.S., Souto, J.T., Campanelli, A.P., Teixeira, M.M., Gazzinelli, R.T. & Silva, J.S. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 67, 4819-4826 (1999).
209. Rezende-Oliveira, K., Silva, N.M., Mineo, J.R. & Rodrigues Junior, V. Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. *Placenta* 33, 682-687 (2012).
210. Coelho, P.S., Klein, A., Talvani, A., Coutinho, S.F., Takeuchi, O., Akira, S., Silva, J.S., Canizzaro, H., Gazzinelli, R.T. & Teixeira, M.M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J Leukoc Biol* 71, 837-844 (2002).
211. Brown, W.C. & Corral, R.S. Stimulation of B lymphocytes, macrophages, and dendritic cells by protozoan DNA. *Microbes Infect* 4, 969-974 (2002).
212. Paiva, C.N., Figueiredo, R.T., Kroll-Palhares, K., Silva, A.A., Silverio, J.C., Gibaldi, D., Pyrrho Ados, S., Benjamim, C.F., Lannes-Vieira, J. & Bozza, M.T. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol* 86, 1239-1246 (2009).
213. Petray, P., Corral, R., Meckert, P. & Laguens, R. Role of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 83, 205-211 (2002).
214. Bilate, A.M., Teixeira, P.C., Ribeiro, S.P., Brito, T., Silva, A.M., Russo, M., Kalil, J. & Cunha-Neto, E. Distinct outcomes of *Trypanosoma cruzi* infection in hamsters are related to myocardial parasitism, cytokine/chemokine gene expression, and protein expression profile. *J Infect Dis* 198, 614-623 (2008).

- 215.** Qin, S., Rottman, J.B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A.E., Moser, B. & Mackay, C.R. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101, 746-754 (1998).
- 216.** Sullivan, N.L., Eickhoff, C.S., Zhang, X., Giddings, O.K., Lane, T.E. & Hoft, D.F. Importance of the CCR5-CCL5 axis for mucosal *Trypanosoma cruzi* protection and B cell activation. *J Immunol* 187, 1358-1368 (2011).
- 217.** Hardison, J.L., Wrightsman, R.A., Carpenter, P.M., Kuziel, W.A., Lane, T.E. & Manning, J.E. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 74, 135-143 (2006).
- 218.** Marino, A.P., Silva, A.A., Santos, P.V., Pinto, L.M., Gazinelli, R.T., Teixeira, M.M. & Lannes-Vieira, J. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1, 93-96 (2005).
- 219.** Gomes, J.A., Bahia-Oliveira, L.M., Rocha, M.O., Busek, S.C., Teixeira, M.M., Silva, J.S. & Correa-Oliveira, R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun* 73, 7960-7966 (2005).
- 220.** Benitez-Hernandez, I., Mendez-Enriquez, E., Ostoa, P., Fortoul, T., Ramirez, J.A., Stempin, C., Cerban, F., Soldevila, G. & Garcia-Zepeda, E.A. Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology* 215, 413-426 (2010).
- 221.** Soares, M.B., de Lima, R.S., Rocha, L.L., Vasconcelos, J.F., Rogatto, S.R., dos Santos, R.R., Iacobas, S., Goldenberg, R.C., Iacobas, D.A., Tanowitz, H.B., de Carvalho, A.C. & Spray, D.C. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis* 202, 416-426 (2010).
- 222.** Guedes, P.M., Veloso, V.M., Talvani, A., Diniz, L.F., Caldas, I.S., Do-Valle-Matta, M.A., Santiago-Silva, J., Chiari, E., Galvao, L.M., Silva, J.S. & Bahia, M.T. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 138, 106-113 (2010).
- 223.** Florez, O., Martin, J. & Gonzalez, C.I. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol* 73, 852-858 (2012).
- 224.** Talvani, A., Rocha, M.O., Ribeiro, A.L., Correa-Oliveira, R. & Teixeira, M.M. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *J Infect Dis* 189, 214-220 (2004).
- 225.** Calzada, J.E., Nieto, A., Beraun, Y. & Martin, J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 58, 154-158 (2001).

- 226.** Fernandez-Mestre, M.T., Montagnani, S. & Layrisse, Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? *Hum Immunol* 65, 725-728 (2004).
- 227.** Reis, D.D., Jones, E.M., Tostes, S., Jr., Lopes, E.R., Gazzinelli, G., Colley, D.G. & McCurley, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 48, 637-644 (1993).
- 228.** Machado, F.S., Koyama, N.S., Carregaro, V., Ferreira, B.R., Milanezi, C.M., Teixeira, M.M., Rossi, M.A. & Silva, J.S. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 191, 627-636 (2005).
- 229.** Hardison, J.L., Kuziel, W.A., Manning, J.E. & Lane, T.E. Chemokine CC receptor 2 is important for acute control of cardiac parasitism but does not contribute to cardiac inflammation after infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 193, 1584-1588 (2006).
- 230.** Marino, A.P., da Silva, A., dos Santos, P., Pinto, L.M., Gazzinelli, R.T., Teixeira, M.M. & Lannes-Vieira, J. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 110, 1443-1449 (2004).
- 231.** Medeiros, G.A., Silverio, J.C., Marino, A.P., Roffe, E., Vieira, V., Kroll-Palhares, K., Carvalho, C.E., Silva, A.A., Teixeira, M.M. & Lannes-Vieira, J. Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. *Microbes Infect* 11, 264-273 (2009).
- 232.** Roffe, E., Oliveira, F., Souza, A.L., Pinho, V., Souza, D.G., Souza, P.R., Russo, R.C., Santiago, H.C., Romanha, A.J., Tanowitz, H.B., Valenzuela, J.G. & Teixeira, M.M. Role of CCL3/MIP-1alpha and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes Infect* 12, 669-676 (2010).
- 233.** Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Jr., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A. & Izzo, N.J., Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2979-2984 (1998).
- 234.** Rhim, J.S., Schell, K., Creasy, B. & Case, W. Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero). *Proc Soc Exp Biol Med* 132, 670-678 (1969).
- 235.** Snyderman, R., Pike, M.C., Fischer, D.G. & Koren, H.S. Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. *J Immunol* 119, 2060-2066 (1977).
- 236.** Taliaferro, W.H. & Pizzi, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 96, 199-226 (1955).

- 237.** Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A. & Bucala, R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* 33, 14144-14155 (1994).
- 238.** Fitzgerald KA, O.N.L., Gearing AJH, Callard RE. En *The Cytokine Factsbook and Webfacts*, (ed. AP Factsbook Series, A.P.) 379-381 (Londres, Reino Unido, 2001).
- 239.** Calandra, T., Spiegel, L.A., Metz, C.N. & Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11383-11388 (1998).
- 240.** Ding, A.H., Nathan, C.F. & Stuehr, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141, 2407-2412 (1988).
- 241.** Gonzalez Cappa, S.M., Chiale, P., del Prado, G.E., Katzin, A.M., de Martini, G.W., de Isola, E.D., Abramo Orrego, L. & Segura, E.L. Isolation of a strain of *Trypanosoma cruzi* from a patient with chronic Chagas cardiomyopathy and its biological characterization. *Medicina (B Aires)* 40 Suppl 1, 63-68 (1980).
- 242.** Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. & Kioussi, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 887, 41-47 (2012).
- 243.** Postan, M., Dvorak, J.A. & McDaniel, J.P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN- mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg* 32, 497-506 (1983).
- 244.** Molina, H.A., Milei, J., Rimoldi, M.T., Gonzalez Cappa, S.M. & Storino, R.A. Histopathology of the heart conducting system in experimental Chagas disease in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82, 241-246 (1988).
- 245.** Postan, M., Cheever, A.W., Dvorak, J.A. & McDaniel, J.P. A histopathological analysis of the course of myocarditis in C3H/He mice infected with *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio-X10/4. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80, 50-55 (1986).
- 246.** Kuschnir, E., Sgammini, H., Castro, R., Evequoz, C., Ledesma, R. & Brunetto, J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol* 45, 249-256 (1985).
- 247.** Yamada, G., Shijubo, N., Takagi-Takahashi, Y., Nishihira, J., Mizue, Y., Kikuchi, K. & Abe, S. Elevated levels of serum macrophage migration inhibitory factor in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Immunol* 104, 123-127 (2002).
- 248.** Biolo, A., Ribeiro, A.L. & Clausell, N. Chagas cardiomyopathy: where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis* 52, 300-316 (2010).

249. Aparecida da Silva, C., Fattori, A., Sousa, A.L., Mazon, S.B., Monte Alegre, S., Almeida, E.A. & Guariento, M.E. Determining the C-reactive protein level in patients with different clinical forms of Chagas disease. *Rev Esp Cardiol* 63, 1096-1099 (2010).
250. Antunez, M.I. & Cardoni, R.L. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* 71, 103-109 (2000).
251. Bimal, S., Singh, S.K., Das, V.N., Sinha, P.K., Gupta, A.K., Bhattacharya, S.K. & Das, P. *Leishmania donovani*: effect of therapy on expression of CD2 antigen and secretion of macrophage migration inhibition factor by T-cells in patients with visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 111, 130-132 (2005).
252. Miller, E.J., Li, J., Leng, L., McDonald, C., Atsumi, T., Bucala, R. & Young, L.H. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature* 451, 578-582 (2008).
253. Wang, J., Tong, C., Yan, X., Yeung, E., Gandavadi, S., Hare, A.A., Du, X., Chen, Y., Xiong, H., Ma, C., Leng, L., Young, L.H., Jorgensen, W.L., Li, J. & Bucala, R. Limiting cardiac ischemic injury by pharmacological augmentation of macrophage migration inhibitory factor-AMP-activated protein kinase signal transduction. *Circulation* 128, 225-236 (2013).
254. Guo, Y., Zhang, Y., Hong, K., Luo, F., Gu, Q., Lu, N. & Bai, A. AMPK inhibition blocks ROS-NFkappaB signaling and attenuates endotoxemia-induced liver injury. *PLoS One* 9, e86881 (2014).
255. Bergeron, M. & Olivier, M. *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. *J Immunol* 177, 6271-6280 (2006).
256. Golden, J.M. & Tarleton, R.L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol* 72, 391-402 (1991).
257. Munoz-Fernandez, M.A., Fernandez, M.A. & Fresno, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 33, 35-40 (1992).
258. Bernhagen, J., Calandra, T. & Bucala, R. The emerging role of MIF in septic shock and infection. *Biotherapy* 8, 123-127 (1994).
259. Liew, F.Y. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 43, 95-98 (1994).
260. Juttner, S., Bernhagen, J., Metz, C.N., Rollinghoff, M., Bucala, R. & Gessner, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J Immunol* 161, 2383-2390 (1998).

261. Das, R., Koo, M.S., Kim, B.H., Jacob, S.T., Subbian, S., Yao, J., Leng, L., Levy, R., Murchison, C., Burman, W.J., Moore, C.C., Scheld, W.M., David, J.R., Kaplan, G., MacMicking, J.D. & Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E2997-3006 (2013).
262. Gutierrez FRS, M.F., Miranda-Santos IKF, Silva JS. Effector mechanisms of macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. En *Protozoans in Macrophages*, (ed. Gazzinelli, E.D.R.) 207-220 (Landes Biosciences, Austin, Texas, EEUU, 2007).
263. Jian, Z., Li, J.B., Ma, R.Y., Chen, L., Zhong, Q.J., Wang, X.F., Wang, W., Hong, Y. & Xiao, Y.B. Increase of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in cardiomyocytes during chronic hypoxia. *Clin Chim Acta* 405, 132-138 (2009).
264. Reimann, J., Schnell, S., Schwartz, S., Kappes-Horn, K., Dodel, R. & Bacher, M. Macrophage migration inhibitory factor in normal human skeletal muscle and inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 654-662 (2010).
265. De Rossi, M., Bernasconi, P., Baggi, F., de Waal Malefyt, R. & Mantegazza, R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol* 12, 1329-1335 (2000).
266. Henao-Martinez, A.F., Schwartz, D.A. & Yang, I.V. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106, 521-527 (2012).
267. Samudio, M., Montenegro-James, S., Cabral, M., Martinez, J., Rojas de Arias, A. & James, M.A. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* 58, 119-121 (1998).
268. Moretti, E., Basso, B., Cervetta, L., Brigada, A. & Barbieri, G. Patterns of cytokines and soluble cellular receptors in the sera of children with acute Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 1324-1327 (2002).
269. Garcia, M.M., De Rissio, A.M., Villalonga, X., Mengoni, E. & Cardoni, R.L. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and their children. *Am J Trop Med Hyg* 78, 499-503 (2008).
270. Dauby, N., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Flores, A., Hermann, E., Cordova, M., Tellez, T., Torrico, F., Truyens, C. & Carlier, Y. Maternal infection with *Trypanosoma cruzi* and congenital Chagas disease induce a trend to a type 1 polarization of infant immune responses to vaccines. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e571 (2009).
271. de Mendonca-Filho, H.T., Gomes, G.S., Nogueira, P.M., Fernandes, M.A., Tura, B.R., Santos, M. & Castro-Faria-Neto, H.C. Macrophage migration inhibitory factor is associated with positive cultures in patients with sepsis after cardiac surgery. *Shock* 24, 313-317 (2005).

- 272.** Kozaci, L.D., Sari, I., Akar, S., Birlik, M., Akkoc, N., Chikanza, I.C. & Onen, F. Serum levels of macrophage migration inhibitory factor and leptin in patients with acute trichinellosis. *Turkiye Parazitol Derg* 34, 156-160 (2010).
- 273.** Delaloye, J., De Bruin, I.J., Darling, K.E., Reymond, M.K., Sweep, F.C., Roger, T., Calandra, T. & Cavassini, M. Increased macrophage migration inhibitory factor (MIF) plasma levels in acute HIV-1 infection. *Cytokine* 60, 338-340 (2012).
- 274.** Bahia-Oliveira, L.M., Gomes, J.A., Cancado, J.R., Ferrari, T.C., Lemos, E.M., Luz, Z.M., Moreira, M.C., Gazzinelli, G. & Correa-Oliveira, R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis* 182, 634-638 (2000).
- 275.** Lopez, L., Arai, K., Gimenez, E., Jimenez, M., Pascuzo, C., Rodriguez-Bonfante, C. & Bonfante-Cabarcas, R. C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. *Rev Esp Cardiol* 59, 50-56 (2006).
- 276.** Poveda, C., Fresno, M., Girones, N., Martins-Filho, O.A., Ramirez, J.D., Santi-Rocca, J., Marin-Neto, J.A., Morillo, C.A., Rosas, F. & Guhl, F. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). *PLoS One* 9, e91154 (2014).
- 277.** Rossi, M.A., Goncalves, S. & Ribeiro-dos-Santos, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am J Pathol* 114, 209-216 (1984).
- 278.** Carvalho, C.M., Andrade, M.C., Xavier, S.S., Mangia, R.H., Britto, C.C., Jansen, A.M., Fernandes, O., Lannes-Vieira, J. & Bonecini-Almeida, M.G. Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography, and radiology. *Am J Trop Med Hyg* 68, 683-691 (2003).
- 279.** Guedes, P.M., Veloso, V.M., Caliari, M.V., Carneiro, C.M., Souza, S.M., de Lana, M., Chiari, E., Bahia, M.T. & Galvao, L.M. *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 141-147 (2007).
- 280.** Yu, C.M., Lai, K.W., Chen, Y.X., Huang, X.R. & Lan, H.Y. Expression of macrophage migration inhibitory factor in acute ischemic myocardial injury. *J Histochem Cytochem* 51, 625-631 (2003).
- 281.** Qi, D., Hu, X., Wu, X., Merk, M., Leng, L., Bucala, R. & Young, L.H. Cardiac macrophage migration inhibitory factor inhibits JNK pathway activation and injury during ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 119, 3807-3816 (2009).
- 282.** Gomes, J.A., Bahia-Oliveira, L.M., Rocha, M.O., Martins-Filho, O.A., Gazzinelli, G. & Correa-Oliveira, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 71, 1185-1193 (2003).

283. Wen, J.J., Vyatkina, G. & Garg, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med* 37, 1821-1833 (2004).
284. Gupta, S., Dhiman, M., Wen, J.J. & Garg, N.J. ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Parasitol* 76, 153-170 (2011).
285. Tillmann, S., Bernhagen, J. & Noels, H. Arrest Functions of the MIF Ligand/Receptor Axes in Atherogenesis. *Front Immunol* 4, 115 (2013).
286. Tarleton, R.L., Sun, J., Zhang, L. & Postan, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun* 62, 1820-1829 (1994).
287. dos Santos, P.V., Roffe, E., Santiago, H.C., Torres, R.A., Marino, A.P., Paiva, C.N., Silva, A.A., Gazzinelli, R.T. & Lannes-Vieira, J. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect* 3, 971-984 (2001).
288. Cuervo, H., Guerrero, N.A., Carbajosa, S., Beschin, A., De Baetselier, P., Girones, N. & Fresno, M. Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 187, 2656-2665 (2011).
289. Simpson, K.D., Templeton, D.J. & Cross, J.V. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Immunol* 189, 5533-5540 (2012).
290. Lannes-Vieira, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 299-304 (2003).
291. Tostes, S., Jr., Bertulucci Rocha-Rodrigues, D., de Araujo Pereira, G. & Rodrigues, V., Jr. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol* 99, 233-237 (2005).
292. Calvet, C.M., Melo, T.G., Garzoni, L.R., Oliveira, F.O., Jr., Neto, D.T., N, S.L.M., Meirelles, L. & Pereira, M.C. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction. *Front Immunol* 3, 327 (2012).
293. Manque, P.A., Probst, C.M., Pereira, M.C., Rampazzo, R.C., Ozaki, L.S., Pavoni, D.P., Silva Neto, D.T., Carvalho, M.R., Xu, P., Serrano, M.G., Alves, J.M., Meirelles Mde, N., Goldenberg, S., Krieger, M.A. & Buck, G.A. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infect Immun* 79, 1855-1862 (2011).
294. Zhang, J., Andrade, Z.A., Yu, Z.X., Andrade, S.G., Takeda, K., Sadirgursky, M. & Ferrans, V.J. Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 31, 581-596 (1999).

- 295.** de Souza, E.M., Araujo-Jorge, T.C., Bailly, C., Lansiaux, A., Batista, M.M., Oliveira, G.M. & Soeiro, M.N. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. *Cell Tissue Res* 314, 223-235 (2003).
- 296.** De Souza, E.M., Meuser-Batista, M., Batista, D.G., Duarte, B.B., Araujo-Jorge, T.C. & Soeiro, M.N. *Trypanosoma cruzi*: alpha-2-macroglobulin regulates host cell apoptosis induced by the parasite infection in vitro. *Exp Parasitol* 118, 331-337 (2008).
- 297.** van den Berg, J.M., Weyer, S., Weening, J.J., Roos, D. & Kuijpers, T.W. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 69, 467-473 (2001).
- 298.** Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J. & Beach, D.H. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190, 1375-1382 (1999).
- 299.** Nguyen, M.T., Lue, H., Kleemann, R., Thiele, M., Tolle, G., Finkelmeier, D., Wagner, E., Braun, A. & Bernhagen, J. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol* 170, 3337-3347 (2003).
- 300.** Liu, L., Chen, J., Ji, C., Zhang, J., Sun, J., Li, Y., Xie, Y., Gu, S. & Mao, Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) interacts with Bim and inhibits Bim-mediated apoptosis. *Mol Cells* 26, 193-199 (2008).
- 301.** Stojanovic, I., Saksida, T., Timotijevic, G., Sandler, S. & Stosic-Grujicic, S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) enhances palmitic acid- and glucose-induced murine beta cell dysfunction and destruction in vitro. *Growth Factors* 30, 385-393 (2012).
- 302.** Gao, L.Y. & Kwai, Y.A. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 8, 306-313 (2000).
- 303.** Sinai, A.P., Payne, T.M., Carmen, J.C., Hardi, L., Watson, S.J. & Molestina, R.E. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34, 381-391 (2004).
- 304.** Laucella, S.A., Segura, E.L., Riarte, A. & Sosa, E.S. Soluble platelet selectin (sP-selectin) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) decrease during therapy with benznidazole in children with indeterminate form of Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 118, 423-427 (1999).
- 305.** Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D.M., Eloi-Santos, S.M., Gontijo, E.D., Teixeira-Carvalho, A. & Martins-Filho, O.A. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate Chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. *BMC Infect Dis* 12, 123 (2012).
- 306.** Maranon, C., Egui, A., Fernandez-Villegas, A., Carrilero, B., Thomas, M.C., Segovia, M. & Lopez, M.C. Benznidazole treatment reduces the induction of

indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzymatic activity in Chagas disease symptomatic patients. *Parasite Immunol* 35, 180-187 (2013).

- 307.** Coura, J.R. & Borges-Pereira, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106, 641-645 (2011).

ANEXO

Consentimientos Informados –
Aprobaciones de los Comités de Ética

INFORMACION y CONSENTIMIENTO ESCRITO

Estudio de la infección de Chagas en mujeres embarazadas y sus recién nacidos. Evaluación de mediadores inmunológicos como posibles marcadores de respuesta inflamatoria efectiva contra *Trypanosoma cruzi*.

Investigadores responsables:

Dr. Jaime M. Altcheh, médico pediatra del Servicio de Parasitología-Chagas del Hospital de Niños R. Gutiérrez, miembro de la Carrera de Investigador Municipal, Gob. Ciudad de Bs.As

Dr. Alejandro Schijman, Investigador Independiente de CONICET, INGEBI.

Fecha.....

Nombre y Apellido del Paciente.....

Fecha de Nacimiento..... Edad.....

Nacionalidad.....

Tipo y N° de Documento.....

Domicilio..... Teléfono.....

N° de identificación:.....

Descripción del Procedimiento

Su doctor ha confirmado que usted es portadora del Mal de Chagas. Se sabe que hasta 7 de cada 100 madres con Mal de Chagas pueden transmitir la infección a sus hijos recién nacidos, causándoles Chagas congénito. Siendo Ud portadora del Mal de Chagas, corre el riesgo de dar a luz un hijo con Chagas congénito.

Este trabajo de investigación ha sido planificado con el objeto de buscar aquellas características del parásito que causa la enfermedad, que puedan ayudar a predecir el riesgo de transmisión congénita. Además, queremos investigar sobre una molécula inflamatoria (el factor de inhibición de la migración de macrófagos, MIF) que pueda servir como indicador precoz del tipo de defensas con las que el bebé responde a la infección. En consecuencia, invitamos a mujeres embarazadas con Mal de Chagas a participar en este estudio.

Su participación permitirá conocer mejor cómo se comporta esta enfermedad durante el embarazo y en los recién nacidos y, en estos últimos, poder hallar un marcador que refleje su capacidad de responder a la infección de manera rápida y efectiva. Esto permitirá tomar las mejores medidas preventivas en el futuro.

Además del seguimiento de rutina durante el embarazo, los controles médicos y los estudios de laboratorio se recolectarán muestras de sangre de la siguiente manera:

- ✓ una cantidad de sangre equivalente a dos cucharadas de té se le tomarán cada 6 semanas durante el embarazo para analizar la evolución de su infección mediante a) una prueba que detecta cantidades mínimas del parásito que causa la enfermedad, llamado *Trypanosoma cruzi*, (conocida como PCR o reacción en

cadena de la polimerasa) y b) estudios de anticuerpos. La cantidad de sangre recolectada no afecta su salud ni la de su bebé.

- ✓ En el parto se tomarán muestras de placenta para analizar la presencia de parásitos.
- ✓ Dentro de las 72 hs del nacimiento, se recolectarán unas gotas de sangre del brazo del recién nacido para saber si adquirió la infección durante el embarazo y para el estudio del marcador inmunológico MIF. Este estudio se les hace a todos los niños nacidos de madre con enfermedad de Chagas. Además, se tomará una pequeña muestra extra de sangre (un cuarto de cucharada de té) para otros estudios (PCR) como se le hicieron a usted. Esta cantidad de sangre no afecta la salud de su bebé. Esta será la última vez que se pinchará a su bebé.

Si el niño se encuentra infectado se le indicará el tratamiento usual con benznidazol, durante dos meses. La droga ha sido aprobada por el Ministerio de Salud Pública desde 1973. La medicación será provista por el Laboratorio de Parasitología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de la Ciudad de Buenos Aires (Servicio de Neonatología - Pediatría de este Hospital) sin cargo alguno y se le entregará en este hospital. Si usted o su bebé sienten alguna molestia, por favor concurren al hospital donde el doctor decidirá si el niño puede continuar o no el tratamiento.

Debe saber que la cantidad de sangre extraída no provoca ningún inconveniente pero en algunos casos se puede producir un hematoma o resultar algo molesto. Todas las muestras tomadas durante este estudio serán conservadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas del INGBI, CONICET, Buenos Aires. Las muestras serán etiquetadas con un código, de tal forma que su origen no pueda ser rastreado por ninguna persona ajena al estudio, esto quiere decir que de ninguna manera personas ajenas al estudio podrán saber que esas muestras de sangre son suyas o de su bebé. Al ingresar al estudio, usted tendrá un seguimiento más frecuente que los que reciben habitualmente los pacientes con Enfermedad de Chagas.

Su identidad será reservada como confidencial, sus datos y los de su bebé serán protegidos por la Ley 25326 de Protección de datos Personales y se respetarán las normativas éticas locales e internacionales vigentes. Los resultados del estudio podrán ser publicados con fines científicos sin dar a conocer su nombre ni el de su bebé o incluir ninguna referencia que pueda identificarlos. Serán identificados solo con codificación por número y letras.

Se lo atenderá sin costo alguno. No recibirá pago alguno por participar en este programa.

Su participación en este estudio es voluntaria. Puede decidir no participar o retirarse en cualquier momento, sin penalidad ni pérdida de los beneficios para usted y su bebé de recibir el seguimiento y tratamiento adecuado. A su vez, su doctor puede retirarlo del estudio si lo considera conveniente.

Si usted tiene alguna pregunta referente a este estudio puede comunicarse con:
Contacto INGBI Dr. Alejandro Schijman – Bioq. Margarita Bisio TE 4783-2871 int 21.
Contacto Htal Ricardo Gutiérrez Dr Jaime Altcheh TE 4963-4122.

Consentimiento

He leído ó se me ha leído el propósito, procedimiento, riesgos y beneficios de participar en este estudio.

Se me ha dado la oportunidad de preguntar y he recibido las respuestas adecuadas. Yo libremente consiento participar en este estudio y acepto que mi hijo participe entendiendo que tengo el derecho de retirarme y/o retirar a mi hijo en cualquier momento sin vernos afectados en nuestro cuidado médico de este momento o posterior.

Firmando este formulario, consiento que los datos recolectados sobre mí y mi hijo estarán disponibles para el comité de ética del Hospital o los entes reguladores oficiales, si así lo requirieran.

Luego de firmar, recibiré una copia del formulario y otra se incorporará a mi historia clínica.

Nombre del paciente _____ Fecha ____/____/____ (día/mes/año) Firma: _____

No de identificación _____

Nombre del Testigo _____ Fecha ____/____/____ (día/mes/año) Firma: _____

Nombre del Investigador _____ Fecha ____/____/____ (día/mes/año) Firma: _____

INFORMACION y CONSENTIMIENTO ESCRITO

- Almacenamiento de muestras -

Estudio de la infección de Chagas en mujeres embarazadas y sus recién nacidos

Fecha.....

Nombre y Apellido del paciente.....

Fecha de Nacimiento..... Edad.....

Nacionalidad.....

Tipo y N° de Documento.....

Domicilio..... Teléfono.....

N° de identificación:.....

Si quedara algún sobrante en sus muestras y las de su hijo después de realizados los análisis mencionados en el consentimiento informado que usted firmó, nos gustaría pedir su permiso para almacenarlas y usarlas en estudios futuros relacionados con la Enfermedad de Chagas durante cinco años posteriores a la firma de este consentimiento. Las muestras serán almacenadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas del INGBI, CONICET, Buenos Aires y etiquetadas de tal forma que su origen no pueda ser rastreado por ninguna persona ajena al estudio.

Sin embargo, usted es libre de no aceptar sin por esto verse afectada su participación en el estudio.

Consentimiento

Firmando este formulario, consiento que las muestras clínicas recolectadas para el estudio arriba mencionado sean almacenadas y puedan ser usadas en estudios futuros hasta 5 años posteriores a la firma de este consentimiento.

Los datos recolectados sobre mí y mi hijo estarán disponibles para el comité de ética del Hospital o los entes reguladores oficiales, si así lo requirieran.

Luego de firmar, recibiré una copia del formulario y otra se incorporará a mi historia clínica.

Nombre del paciente _____ Fecha _____/_____/_____ (día/mes/año) Firma: _____

No de identificación _____

Nombre del Testigo _____ Fecha _____/_____/_____ (día/mes/año) Firma: _____

Nombre del Investigador _____ Fecha _____/_____/_____ (día/mes/año) Firma: _____

1 FICHA PERSONAL MADRE

PACIENTE: _____ HC: _____ HC Gral.: _____

FECHA DE NACIMIENTO: _____ EDAD: _____

PROCEDENCIA (país, ciudad): _____

TRANSFUSIONES: si no

PERMANENCIA O VIAJES A AREA ENDÉMICA: _____

Serología para Chagas: ELISA _____ HAI _____ Fecha _____

CLÍNICA

Recibió tratamiento para Chagas: si no Fecha _____

Hijos anteriores _____ Fecha de nacimiento _____ Diagnóstico Chagas _____

2 FICHA DEL BEBÉ (Marcadores inmunológicos)

NOMBRE DE LA MADRE: _____

HC: _____

NOMBRE DEL BEBÉ: _____

FECHA DE NACIMIENTO: _____ MICROHEMATOCRITO: _____

FECHA TOMA MUESTRA: _____

GESTACIÓN EN CURSO: FUM: _____ FPP: _____

Muestra 1
Fecha _____
Semana de gest. _____

Muestra 4
Fecha _____
Semana de gest. _____

Muestra 2
Fecha _____
Semana de gest. _____

Muestra 5
Fecha _____
Semana de gest. _____

Muestra 3
Fecha _____
Semana de gest. _____

NACIMIENTO:

Datos neonatología:

Parasitemia:

ESTUDIO DE PLACENTA:

CONSENTIMIENTO PARA PADRES O TUTORES DE NIÑOS/AS PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO

Servicio Parasitología y Chagas. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Marcadores inmunológicos en pacientes pediátricos con enfermedad de Chagas tratados con benznidazol: evaluación de su potencial como criterio de eficacia terapéutica o pronóstico.

Fecha.....

Investigadores responsables:

Dra. Patricia B. Petray, Investigadora Adjunta, miembro de la Carrera de Investigador del CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Dr. Jaime M. Altcheh, médico pediatra del Servicio de Parasitología-Chagas del Hospital de Niños R. Gutiérrez, miembro de la Carrera de Investigador Municipal, Gob. Ciudad de Bs.As

Organización: Servicio de Parasitología y Chagas. Hospital de Niños R. Gutiérrez

Nosotros somos médicos que atendemos pacientes y trabajamos en el estudio y tratamiento de la enfermedad de Chagas tanto en niños como en adultos.

Objetivo:

Descubrir nuevos métodos para seguir el tratamiento de niños/as con enfermedad de Chagas y así saber mejor y más rápido cuando estén curados, o cómo progresa la enfermedad.

Procedimientos:

Para saber si su hijo/a tiene enfermedad de Chagas se le extraerá una muestra de sangre (una cuchara de postre). Esta infección se produce por un parásito que vive en la sangre llamado *Trypanosoma cruzi*. Como nosotros estamos buscando unas sustancias que miden inflamación por la enfermedad, queríamos pedirle que en la misma extracción de sangre, le podamos tomar una pequeña cantidad de sangre extra (en total sería como una cuchara de sopa).

En esto hay dos posibilidades: si su hijo/a tiene la enfermedad de Chagas la cual ha podido ser adquirida por la picadura de la vinchuca, durante el embarazo o por una transfusión de sangre, recibirá tratamiento. Si no, su hijo/a formará parte del grupo control y no se le realizarán nuevas extracciones.

Si su hijo/a tiene la enfermedad, Ud. va a iniciar el tratamiento habitual de su niño/a con un medicamento llamado benznidazol. Este tratamiento durará 2 meses y por lo general casi seguramente su niño/a se curará. Este medicamento está aprobado por el Ministerio de Salud Pública y se utiliza desde el año 1973. Es importante que usted sepa que este medicamento es bien tolerado a la dosis con la cual vamos a tratar a su niño/a. Sin embargo, algunas veces, puede producir náuseas, dolor de cabeza, mareos, cansancio y trastornos digestivos que pueden aparecer al comienzo del tratamiento. En el curso de la primera o segunda semana de tratamiento pueden aparecer reacciones en la piel como pueden ser enrojecimiento, picazón, ronchas. A partir de los 30 días, pueden manifestarse dolores o molestias en brazos y piernas. Si estas molestias fueran intensas

y se acompañan de fiebre y manchas, concurra inmediatamente al hospital. El doctor decidirá si el niño/a puede continuar o suspender el tratamiento.

Se han observado manifestaciones en la sangre con disminución de los glóbulos blancos y plaquetas. El tratamiento de su niño y la medicación será realizada por nosotros en forma gratuita como parte de la atención habitual del paciente con enfermedad de Chagas.

Para saber si está curado, se realizarán controles médicos y exámenes de sangre durante y luego de terminado el tratamiento. Se dice que su niño/a está curado cuando los estudios de sangre (anticuerpos) son negativos; esto suele observarse luego de varios años.

Este estudio se hará para buscar nuevas sustancias en la sangre que muestran inflamación por la enfermedad de Chagas. Si estas sustancias se van luego de recibir el tratamiento, podríamos decir que el tratamiento sirvió.

Por lo tanto, nosotros estamos invitando a todos los niños con la enfermedad de Chagas para que nos permita usar su sangre en un estudio donde se verifiquen esas nuevas sustancias que permitirán mejorar el conocimiento sobre la enfermedad de Chagas y la atención de los niños y adultos con esta enfermedad.

La decisión de que su niño/a participe o no en este estudio de ningún modo afectará la calidad y el cuidado que le daremos a su niño/a durante el tratamiento.

La participación en este estudio que durará 6 meses no agregará visitas, ni extracciones de sangre adicionales a la que recibe cualquier niño/a que esté en tratamiento para esta enfermedad.

Para su información los controles médicos y los estudios de laboratorio (Extracción de sangre) se realizan habitualmente con todos nuestros pacientes es el siguiente:

- a) durante el tratamiento que dura 2 meses: visitas a los 7, a los 30 y a los 60 días.
- b) después de finalizado el tratamiento: cada 3 meses el primer año y luego cada 6 meses hasta completar 3 años.

Durante este estudio, se le solicitará que además de las extracciones de sangre (equivalente a una cucharada de postre) que normalmente se hacen en las visitas a los 7, a los 30 y a los 60 días, se le extraiga el equivalente de una cucharada sopera previa al tratamiento, a los 60 días (fin del tratamiento) y a los 6 meses.

Con esta sangre extra nosotros haremos el estudio nuevo para buscar esas sustancias que nos indicarían si el tratamiento sirvió. La sangre será guardada en una heladera durante 20 años en el Servicio de Parasitología y Chagas del Hospital de Niños R. Gutiérrez en Buenos Aires, a los fines de este estudio.

Por otro lado debe saber que la cantidad de sangre extraída no provoca ningún inconveniente.

Riesgo y molestias

Las extracciones de sangre ocasionalmente pueden producir un hematoma o generar un leve malestar. La cantidad de sangre que se extrae no suele causar anemia ni problemas

en las defensas de su hijo/a. Queremos contarle que estas molestias no son diferentes por participar en este estudio.

Beneficios:

Su hijo/a no obtendrá ningún beneficio extra por la participación en este estudio. Pero ayudará a poder saber más rápidamente si está curado un paciente que recibe tratamiento.

Este trabajo podría no beneficiar a la sociedad inmediatamente, pero las generaciones futuras posiblemente se beneficiarán.

Incentivos:

No recibirán pagos por participar en este estudio.

En el caso que sea necesario ustedes recibirán el reembolso del costo de traslado al Hospital para cada visita.

Confidencialidad

La identidad de su hijo/a será reservada como confidencial, como así los resultados de los estudios realizados mediante la identificación por un código de números y letras. Sin embargo estos datos podrán ser revisados y controlados por personal de la OMS para el control de los mismos. Los resultados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas preservando su identidad.

Derecho a no participar o a retirarse:

Su participación en este estudio es voluntaria. Ud. puede decidir que su hijo/a no participe o retirarlo cuando Ud. lo considere, sin perder la posibilidad de que el niño/a reciba el tratamiento y el seguimiento adecuado para la enfermedad de Chagas. A su vez el niño/a puede ser retirado del estudio por decisión de su doctor.

Personas con las que puede contactarse:

Si Ud. tiene alguna pregunta referente a este estudio puede comunicarse con:

Dr. Jaime Altcheh o Dra Patricia Petray al Laboratorio de Parasitología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires. TE. 4963 4122.

Dr. Miguel Del Valle del Comité de Bioética, Dra. Noemí Rivas del Comité de Docencia e Investigación, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires. TE: 4962 9265.

Consentimiento

Nombre y Apellido del paciente.....

No de identificación:.....

Lugar del Estudio: Hosp. de Niños Ricardo Gutiérrez

Investigador: Investigador que toma el consentimiento

Mi niño/a ha sido invitado a participar en este estudio. El propósito de este estudio es la búsqueda de una nueva sustancia que mide inflamación y que permitirá saber si el tratamiento sirvió. Los procedimientos no serán diferentes a los que habitualmente recibe un niño/a con enfermedad de Chagas con la excepción que se extraerá una mayor cantidad de sangre. De por sí el estudio no genera riesgos adicionales al tratamiento y el seguimiento normal. Entiendo que no hay un beneficio directo para mi niño/a, sin embargo su participación podría ayudar a resolver un problema de salud. No recibiré

pagos por participar en este estudio. En el caso que sea necesario se me reembolsará el costo de traslado al hospital para cada visita.

Yo he leído ó se me ha leído toda la informa que se menciona anteriormente. Se me ha dado la oportunidad de preguntar y he recibido las respuestas adecuadas. Yo sé que puedo no participar y esto no significará penalidad ni modificación en la atención que recibirá el niño/a. Si decido que el niño/a participe puedo retirarlo cuando lo considere conveniente sin perder la oportunidad de que reciba tratamiento adecuado. Yo libremente acepto que el niño/a participe en este estudio. Lugo de firmar recibiré una copia del formulario.

Nombre del paciente _____

Lugar: _____

Nombre y firma del tutor: _____

Fecha: ____/____/____(dd/mm/aaaa)

Testigo _____

Fecha: ____/____/____(dd/mm/aaaa)

Usted está de acuerdo con que:

(i) La sangre de su niño/a será guardada en una heladera en el laboratorio de Parasitología y Chagas del Hospital de Niños R. Gutiérrez en Buenos Aires SI____, NO____.

(ii) durante: 20 años, SI____, NO____; menos de 20 años (indique cuantos) ____ años.

(iii) Podrá ser utilizada para estudios posteriores solo relacionados a la enfermedad de Chagas, SI____, NO____.

(iv) La sangre será guardada indicando su nombre:

SI____, NO____, prefiero que sea guardada con un código que proteje su identidad.

ASENTIMIENTO PARA NIÑOS QUE PARTICIPEN EN EL PROYECTO

Marcadores inmunológicos en pacientes pediátricos con enfermedad de Chagas tratados con benznidazol: evaluación de su potencial como criterio de eficacia terapéutica o pronosis.

Fecha / /

Nombre y Apellido: Edad:

FN: / /

Luego de haberte explicado a vos y a tus padres porqué se produce la enfermedad de Chagas y cuáles son los riesgos por tenerla, queremos contarte que te vamos a sacar sangre para saber si tenés enfermedad de Chagas y te pedimos permiso para, con el mismo pinchazo, sacarte un poquito más de sangre (una cuchara de sopa). Esto es para buscar unas sustancias que miden inflamación en la sangre.

Si no estás enfermo, formarás parte de un grupo que se llama control, y no vamos a volver a pincharte.

Si confirmamos que tenés Chagas, para curarte te indicaremos un tratamiento con pastillas. Este tratamiento es el que le indicamos a todos los niños. Los médicos que

tratamos a los niños con infección por Chagas del Hospital, te estamos invitando a participar en este estudio que nos ayudará a saber si el tratamiento sirvió, buscando unas sustancias en la sangre que miden la inflamación que produce la enfermedad de Chagas.

Deberás venir al hospital varias veces luego de iniciado el tratamiento, como lo hacen todos los chicos que tratamos.

- 1.** a los 7 días
- 2.** a los 30 días
- 3.** a los 60 días. En este momento termina el tratamiento.
- 4.** Luego tenés que venir cada 3 meses durante 1 año y luego cada 6 meses por 2 años más.

En cada consulta tenemos que sacarte un poco de sangre. Esto puede molestar un poco pero haremos todo lo posible para que las molestias sean mínimas. En la visita anterior al tratamiento, a los 60 días (fin del tratamiento) y a los 6 meses te sacaremos un poco más de sangre (una cuchara de sopa en cada extracción).

Los resultados quizás no te van a servir directamente a vos, sino más adelante a todos los chicos que tienen la enfermedad de Chagas.

Queremos contarte que no estás obligado a participar. Tu decisión no va a cambiar nuestra forma de atenderte y siempre haremos lo posible para que estés cómodo participes o no del estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Servicio Parasitología y Chagas. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Participación de quimioquinas en los mecanismos inmunopatogénicos de la Enfermedad de Chagas.

INVESTIGADOR: Dr. Ricardo Corral y Dr. Eduardo Schapachnik

TELÉFONO: Dr Corral 4963-4122, Dr Schapachnik 154-927-5421

INTRODUCCIÓN

Este consentimiento puede contener palabras que Usted no entienda. Por favor lea con cuidado el formulario y formule al médico del estudio cualquier pregunta al respecto o solicite la aclaración que necesite. El documento consta de un total de 6 páginas que están numeradas del 1 al 6.

Antes de aceptar participar en este estudio es importante que comprenda la siguiente explicación referente a los procedimientos, beneficios y potenciales riesgos del presente estudio. Este consentimiento explica los beneficios, riesgos, incomodidades y precauciones relacionadas con el estudio. También explica su derecho de retirarse del estudio en cualquier momento.

No se pueden realizar garantías ni reaseguros relacionados con los resultados que se obtengan.

Si Usted tiene menos de 21 años no puede ingresar en este estudio excepto que cuente con la debida autorización de sus padres o tutores. Es importante que le indique a su médico todos sus antecedentes de salud para su mejor control y cuidado durante el estudio.

Este estudio científico será llevado adelante por médicos investigadores pertenecientes a la División Cardiología del Hospital General de Agudos "Dr. Cosme Argerich" y el Laboratorio de Parasitología y Enfermedad de Chagas del Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez".

Usted ha sido invitado a participar del mismo porque presenta alguna de estas tres condiciones

- a) padece Enfermedad de Chagas;
- b) padece insuficiencia cardíaca cuyo origen no es la Enfermedad de Chagas;
- c) es una persona normal que no padece Enfermedad de Chagas ni insuficiencia cardíaca.

Tal condición le es informada a Usted a continuación:

Usted padece Enfermedad de Chagas: _____

Usted padece insuficiencia cardíaca: _____

Usted no padece Enfermedad de Chagas ni insuficiencia cardíaca: _____

Si su médico ha determinado que Usted padece Enfermedad de Chagas ello significa que Usted ha entrado en contacto con un parásito llamado Trypanosoma cruzi. La mayoría de las veces este parásito ingresa al organismo a través de las defecaciones de un insecto

popularmente conocido como vinchuca, el cual suele defecar cuando se alimenta de la sangre de la persona a la que pica.

Otras veces este parásito ingresa a través de una transfusión de sangre, si la persona que la donó se hallaba ya parasitada por el *Trypanosoma cruzi*. Más raramente, una madre que tiene la Enfermedad de Chagas puede transmitirle el parásito a su bebé en el momento del nacimiento. Otras situaciones de contacto con el parásito son aún más raras (por ejemplo, un trasplante de órganos, un accidente de laboratorio y otras que no están debidamente comprobadas científicamente).

El contacto con el *Trypanosoma cruzi* (o sea padecer la Enfermedad de Chagas, o ser "chagásico" como suelen decir de sí mismos muchas personas) en el 80% de los casos no implica tener alterado el corazón, órganos del aparato digestivo como el esófago o el intestino grueso, el sistema nervioso u otros órganos. Sólo en un 20% de los casos puede producirse alguna lesión de alguno de estos órganos y tan sólo en un 5% de este grupo aquella lesión puede ser de cierta importancia produciendo insuficiencia cardíaca.

El significado del concepto de "insuficiencia cardíaca" se explica a continuación ya que la misma puede ser producida por otras causas diferentes a la Enfermedad de Chagas.

Como quedó expresado más arriba, en este estudio habrá pacientes que tienen insuficiencia cardíaca producida por causas distintas a la Enfermedad de Chagas y que son asistidos en el Consultorio de Insuficiencia cardíaca o en el Consultorio general de Cardiología.

Insuficiencia cardíaca se refiere a que su corazón tiene cierta incapacidad de bombear la sangre, algo que le puede ocasionar falta de aire, fatiga y/o hinchazón en las piernas lo cual se llama edema o en el hígado o en otras partes del cuerpo (por ejemplo en la espalda).

Usted puede ser una persona que no padece ni Enfermedad de Chagas ni insuficiencia cardíaca, y que explicado de los motivos de este estudio ha aceptado participar voluntariamente del mismo.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

El propósito de este estudio es determinar si existe un proceso de inflamación relacionado a su condición y establecer si hay diferencias vinculadas a esto según si Usted padece Enfermedad de Chagas, insuficiencia cardíaca o ninguna de las dos. Este estado de inflamación es detectado mediante un análisis de sangre especial en el cual se buscan unas sustancias llamadas quimioquinas.

Estudios científicos realizados alrededor del mundo han demostrado que estas sustancias juegan un papel importante en enfermedades como la artritis reumatoidea, el infarto de miocardio y en otras condiciones. El interés de su doctor y de los investigadores que también participan de este proyecto es determinar si también ello acontece y en qué grado en la Enfermedad de Chagas y en la insuficiencia cardíaca, para lo cual se hace necesario también realizar el mismo análisis de sangre a un grupo de personas que no las padezcan para realizar las correspondientes comparaciones.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Participarán en este estudio 45 personas en quienes se ha determinado que presentan enfermedad de Chagas, en 15 en quienes se ha hallado insuficiencia cardíaca y en otras 15 que no presentan ni una ni la otra. Todos los pacientes se asisten en el Consultorio externo de Cardiología del Hospital General de Agudos Dr. Cosme Argerich, en las áreas de "Enfermedad de Chagas", "Insuficiencia cardíaca" o "Consultorio general".

Como es de rutina para estudiar la afección que Usted padece, su Doctor le realizará una Historia Clínica, preguntándole sobre sus síntomas y antecedentes anteriores,

medicamentos que toma, enfermedades que padezcan otros miembros de su familia y le realizará un examen físico donde el médico tomará nota de su presión arterial, frecuencia cardíaca, auscultará su corazón y sus pulmones, le palpará el abdomen.

Además le solicitará se le realicen un electrocardiograma, una radiografía de tórax, un ecocardiograma y los análisis de laboratorio de rutina.

Si su doctor llegara a considerarlo necesario para su estado de salud y beneficioso para la misma, podrá realizarle otros estudios, pero los mismos no son requeridos para la presente investigación.

Una vez completado esta etapa, luego que su Doctor le informe de este estudio científico y que lo invite a participar del mismo, en caso de estar Usted de acuerdo, convendrá con Usted una fecha y hora para concurrir al gabinete de extracciones del Laboratorio del Hospital en donde le extraerán aproximadamente 10 centímetros cúbicos de sangre para realizar un análisis confirmatorio de si Usted padece o no Enfermedad de Chagas y otro para estudiar la presencia de las mencionadas quimioquinas. Estos análisis se realizarán en el Laboratorio de Parasitología y Enfermedad de Chagas del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, a los cuales se remitirá la muestra de sangre extraída.

Los doctores de estos laboratorios no serán informados en este momento acerca de su nombre ni de si Usted padece Enfermedad de Chagas, insuficiencia cardíaca o ninguna de ellas, ya que el tubo que contendrá la sangre será identificada por un código otorgado en el momento de la extracción que permitirá identificarlo a posteriori de conocerse los resultados. Este método de no informarles acerca de su condición es común en las investigaciones científicas y se denomina método ciego, lo cual significa que al realizar los estudios ellos no se verán influenciados por el diagnóstico que a Usted le han dado en el Hospital Argerich.

Como se expresó más arriba, una parte de esta muestra de sangre que le extrajeron, será enviada al Laboratorio de Parasitología y Enf. De Chagas del Hospital de Niños donde otro equipo de doctores realizarán la búsqueda de estas quimioquinas.

RIESGOS O INCOMODIDADES

Durante el estudio se le realizarán dos extracciones de sangre. La primera para la realización de los análisis de laboratorio de rutina y la segunda, para el análisis especial de búsqueda de quimioquinas. En cada una de estas extracciones no harán falta más que el equivalente a tres cucharaditas de te de sangre. Cada procedimiento de extracción de sangre puede ocasionarle cierta molestia por el pinchazo, inflamación, moretón o pequeño sangrado en el sitio de la extracción. Algunas personas suelen experimentar mareos cuando se les extrae sangre o a posteriori. También existe la posibilidad de una infección, pero se tomarán medidas para evitar estas molestias o disminuirlas al mínimo. El electrocardiograma, la radiografía y el ecocardiograma representan riesgos mínimos para su salud.

RIESGOS INESPERADOS

Siendo que a los fines de esta investigación no se requiere que se le indique ningún tratamiento especial, más allá que el que su doctor le hubiese indicado por la enfermedad que usted tuviera y siendo que el único procedimiento será la realización de los estudios que han sido explicitados, no son esperables otros riesgos que los comentados.

BENEFICIOS POTENCIALES

La información que surja cuando se conozcan los resultados de esta investigación podrá beneficiarlo a Usted y a otros pacientes con su misma enfermedad.

Si Usted no padece ninguna enfermedad y fue invitado a participar del estudio, obtendrá un informe pormenorizado sobre su estado de salud que surja de los estudios que se le han realizado y habrá contribuido solidariamente para la realización de una investigación científica.

En todos los casos todos los estudios que se realizan son gratuitos para Usted.

NUEVOS HALLAZGOS

Los resultados del estudio se conocerán al cabo de un año de iniciado, aproximadamente y le serán informados aquellos hallazgos que puedan ser de su interés y los que hagan al conocimiento de su estado de salud.

COSTOS Y COMPENSACIONES

Todas las consultas y estudios que se realicen serán absolutamente gratuitos.

Usted no recibirá ningún pago monetario por la participación en este estudio.

CONFIDENCIALIDAD

Su identidad y toda información acerca de Usted, incluyendo su historia clínica, datos de laboratorio y hallazgo de los exámenes físicos serán mantenidos en confidencialidad según lo establecido por la ley.

Usted toma conocimiento a partir de la lectura de este documento que toda la información relacionada con su participación en este estudio puede ser inspeccionada por funcionarios de Salud del gobierno de la Ciudad de Buenos Aires y por el Comité de Ética de los Hospitales Argerich y Ricardo Gutiérrez.

Los resultados del estudio podrán ser presentados en Congresos Médicos o publicaciones científicas pero en todos los casos su identidad no será revelada.

DAÑOS RELACIONADOS CON LA INVESTIGACIÓN

La firma de este consentimiento no implica la renuncia a ninguno de los derechos legales previstos por la normativa vigente, para el caso de lesiones o daños relacionados con su participación en el estudio, si bien la posibilidad de que se produzcan es mínima.

DUDAS. CONTACTO CON EL COMITÉ DE ÉTICA

Ante cualquier duda relacionada con el estudio, contacte al médico encargado del estudio o a sus colegas del Hospital Argerich o comuníquese al siguiente teléfono: 15-4927-5421. Si tiene dudas de sus derechos como paciente y de este estudio de investigación puede contactar al Comité de Ética del Hospital Argerich. Este comité está instituido para proteger los derechos de los pacientes que participan en estudios clínicos.

PARTICIPACION VOLUNTARIA / RETIRO DEL ESTUDIO

Su participación en este estudio es voluntaria. Ud. podrá negarse a participar o retirarse del mismo en cualquier momento, no será penalizado por ello ni perderá los beneficios.

Si se niega a participar o se retira del estudio antes de que este finalice, no se verá afectada la calidad ni la disponibilidad de su atención médica.

El médico del estudio puede pedirle que abandone el estudio sin su consentimiento en caso que Usted no siga el plan de estudios, sufra alguna lesión relacionada con el estudio o por alguna otra razón.

CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE

He leído y comprendido la información previa. Los riesgos y beneficios de este estudio me han sido debidamente explicados por una persona responsable del mismo. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tengo otras preguntas o si experimento otros problemas relacionados con la investigación contactaré al Dr. Edgardo Schapachnik, teléfono 15-4927-5421.

Autorizo que mis registros médicos puedan ser inspeccionados por la autoridad competente y por los Comités de Ética de los Hospitales Argerich y Ricardo Gutiérrez. Mediante la firma de este documento, acepto participar voluntariamente en este estudio, puedo negarme a participar o retirarme del mismo en cualquier momento, no será penalizado ni perderé mis derechos. No declino de ningún derecho legal que tendría si no estuviese participando de este estudio. Mi firma implica que he leído y entendido este consentimiento y se han contestado todas mis preguntas referentes a los procedimientos del estudio, posibles riesgos, beneficios. He recibido una copia firmada y fechada de este documento. Mi médico de cabecera será informado de mi participación en el estudio.

Firma y aclaración del paciente*
Fecha
(*Letra de imprenta, llenado por el paciente)

Tipo y Nro de documento

Firma y aclaración del padre/madre
Fecha
y/o tutor legal*
(*Letra de imprenta, llenado por el tutor)

Tipo y Nro de documento

Firma y aclaración del testigo*
Fecha
(*Letra de imprenta, llenado por el testigo)

Tipo y Nro de documento

El paciente arriba mencionado ha sido debidamente informado acerca del estudio.

Firma y aclaración del investigador*
Fecha
(*Letra de imprenta, llenado por el investigador autorizado que explicó el consentimiento)

Tipo y Nro de documento

HOSPITAL DE NIÑOS RICARDO GUTIERREZ
COMITÉ DE BIOÉTICA
Subcomité de Ética en Investigación

HNRG

Galpo 1330 Ciudad Autónoma de Buenos Aires- Argentina
 Tel. directo- 4962- 2946
 www.hnrg.gov.ar/bioetica - comite.bioetica.hnrg@gmail.com

Buenos Aires, 22 de Abril de 2009.-

Resolución del Comité de Bioética, Subcomité de Investigación, sobre:
proyecto nuevo; información y consentimiento informado y/o aviso de reclutamiento.

Título Protocolo: Estudio de la infección de Chagas en mujeres embarazadas y sus recién nacidos . Evaluación de mediadores inmunológicos como posibles marcadores de respuesta inflamatoria efectiva contra *Trypanosoma cruzi*.

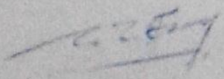
Investigador Principal: Dr. Jaime Altcheh
Lugar de realización: Parasitología-Chagas, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez
Nº CB-HNRG: 09020
Documentos revisados: Estudio de la infección de Chagas en mujeres embarazadas y sus recién nacidos

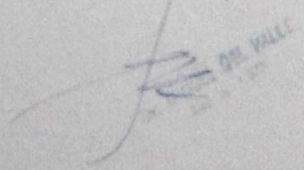
Dictamen y justificación:
 Estimado Dr. Altcheh,
 Parasitología-Chagas
 Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez
 S/D
 De nuestra consideración,

Luego de haber revisado los documentos amba mencionados, nos dirigimos a Ud. a fin de informarle que en el día la fecha el Comité de Bioética, Subcomité de Investigación, ha aprobado para su realización en el Hospital:

Estudio de la infección de Chagas en mujeres embarazadas y sus recién nacidos

Saludamos a Ud. atte.,


 DR. GERMA ABEL CARRA
 PRESIDENTE
 22.04.2009


 DR. GERMA ABEL CARRA
 PRESIDENTE
 22.04.2009

COMITÉ DE BIOÉTICA
 HOSPITAL DE NIÑOS
 RICARDO GUTIERREZ



Buenos Aires, 6 de Septiembre de 2004

Dr. Ricardo Corral
Laboratorio Parasitología
Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez

De nuestra consideración:

Nos dirigimos a Ud. en su carácter de investigador principal del protocolo "Marcadores inmunológicos en pacientes pediátricos con enfermedad de Chagas tratados con benznidazol" para comunicarle que en la reunión de la fecha el Comité ha aprobado la realización de dicho estudio en nuestra Institución.

Sin otro motivo, saludamos a Ud. atte.

GRACIELA C. CÁDIZO
MÉDICA
M.N. 48394

Dr. MARIA MABEL GARRA
FARMACEUTICA
M.N. 10616

Dr. MIGUEL DEL VALLE
Aut. Inv. 41872

SELINGER CECILIA
MEDICA PEDIATRA
M.N. 40508 M.P. 48674

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
HOSPITAL GRAL. DE AGUDOS "C. ARGERICH"
Comité de Bioética


Buenos Aires, 21 de octubre de 2004

Dr. Schapachnik / Dr. Montañana
S...../.....D

De nuestra mayor consideración:

Tenemos el agrado de dirigirnos a Ud. a fin de informarle que este Comité ha evaluado y aprobado el Protocolo de Investigación "Participación de Quimioquinas en los mecanismos inmunopatogénicos de la Enfermedad de Chagas".

Sin otro particular, lo saludamos atentamente


Dr. Andrés Bertorello
Integrante del CBE


Dra. Claudia Rodríguez
Coordinadora